DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN PROBLEMAS AMBIENTALES E INDUSTRIALES

JOSÉ MANUEL HERRERO MARTÍNEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a Valencia el día 18 de desembre de 2000 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Francisco Bosch Reig
- Dra. Dña. María Teresa Galcerán Huguet
- Dr. D. Pier Giorgio Righetti
- Dra. Dña. Rosa Herráez Hernández
- Dr. D. Atilio Citterio

Va ser dirigida per:
Prof. Dr . D. Guillermo Ramis Ramos i Ernesto F. Simó Alfonso

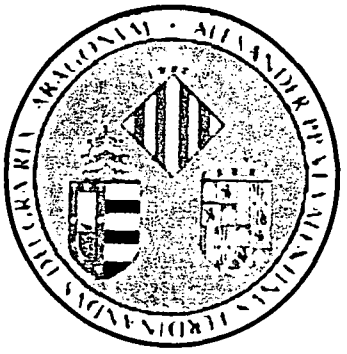
©Copyright: Servei de Publicacions
José Manuel Herrero Martínez

Depòsit legal:
I.S.B.N.:84-370-5460-5
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



DESARROLLO DE MÉTODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN PROBLEMAS AMBIENTALES E INDUSTRIALES

TESIS DOCTORAL

JOSÉ MANUEL HERRERO MARTÍNEZ

Valencia, Septiembre de 2000

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE QUÍMIQUES

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL CONTROL DE CALIDAD EN PROBLEMAS AMBIENTALES E INDUSTRIALES

MEMORIA que para alcanzar el Grado de Doctor en Química presenta el Licenciado

José Manuel Herrero Martínez

Burjassot, Septiembre de 2000

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

D. GUILLERMO RAMIS RAMOS y D. ERNESTO FCO. SIMÓ ALFONSO, Catedrático y Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València,

CERTIFICAN

que la presente Memoria, *Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para el control de calidad en problemas ambientales e industriales*, constituye la Tesis Doctoral de D. JOSÉ MANUEL HERRERO MARTÍNEZ.

Asimismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los distintos aspectos del trabajo, como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos y a petición del interesado, firmamos la presente en Burjassot, a 26 de septiembre de 2000.

Guillermo Ramis Ramos

Ernesto Fco. Simó Alfonso

Este trabajo ha sido realizado gracias a una beca de formación de personal investigador de la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

A mis directores de tesis Guillermo Ramis Ramos y Ernesto F. Simó Alfonso por la dirección y supervisión de este trabajo, a los cuales quiero manifestar mi gratitud por la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

A Pier Giorgio Righetti por su ayuda y consejos útiles que me dedicó durante mi estancia en Verona.

A todos mis amigos y compañeros del Departamento de Química Analítica, por su apoyo y confianza: Sam, Juanfran, Mohamed, Sergio y esposa, David, Fran, Mª José, Eva, Sagrario, José María, Inma, Yolanda, Marta, José, Mar, Amparo, Juanjo, Silvia, Carmen Molins, Carmen Quiñones, Mónica, Laura, Luis y Alberto, y a otros muchos más compañeros y profesores del Departamento con los que ha sido una verdadera satisfacción relacionarme y trabajar juntos.

A mis compañeros de la Universidad de Verona: Erna, Laura, Soffie, Alessandra, Massimiliano, Mario y Cecilia por su amistad y los buenos momentos que junto a ellos pasé.

A Angeles, Vicente y Eva Barreno del Departamento de Fisiología Vegetal por sus valiosas sugerencias que compartieron conmigo durante el desarrollo de este trabajo.

Y naturalmente, a mis amigos de fuera del Departamento, por su cariño y apoyo, y porque siempre me animaron a seguir adelante.

Asimismo, agradecer de forma especial y significativa a mis padres, hermana y familia, por su apoyo incondicional y constante ánimo en todo momento.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a Ana por su apoyo incondicional, paciencia e interés.

A todos ellos les agradezco sinceramente que hayan contribuido a mi formación no sólo académica sino también humana.

Desde el fondo de mi alma,

a mi madre,

a mi padre,

a mi hermana y

a Ana

ÍNDICE

CAPÍTULO I. OBJETO Y PLAN DE TRABAJO 1

CAPÍTULO II. LA ELECTROFORESIS CAPILAR 7

II.1. Introducción a la electroforesis capilar 9
II.2. El mecanismo de separación en electroforesis capilar 10
II.3. El flujo electroosmótico 11
II.4. Movilidad y tiempo de migración 16
II.5. Dispersión de zona controlada por difusión 16
II.6. Interacciones soluto-pared 18
II.7. Resolución 19
II.8. Modificaciones en la pared del capilar 20
II.9. Modos de operación en electroforesis capilar 23
II.9.1. Electroforesis capilar zonal 23
a) Selección del tampón en CZE 24
b) Tampones isoeléctricos 25
c) Aditivos modificadores de la selectividad en CZE . 27
II.9.2. Cromatografía micelar electrocinética 28
a) Selección del tensioactivo 30
b) Sales biliares 32
c) Aditivos en MEKC 35
II.9.3. Electroforesis capilar en gel 35
II.9.4. Isoelectroenfoque capilar 36
II.9.5. Isotacoforesis capilar 37
II.9.6. Electrocromatografía capilar 37
II.10. Perspectivas futuras de la electroforesis capilar 38
II.11. Referencias 39

PARTE A. SISTEMAS REDOX ÁCIDO L-ASCÓRBICO/DEHIDROASCÓRBICO Y GLUTATIÓN/GLUTATIÓN DISULFURO COMO INDICADORES DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL 43

CAPÍTULO III. SISTEMAS REDOX COMO INDICADORES DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA 45

III.1. El estrés ambiental 47
III.2. Estrés por contaminantes ambientales 49
III.2.1. Contaminantes atmosféricos 50
III.2.2. Respuestas al estrés por contaminantes atmosféricos en plantas 51
a) Ozono 51
b) Dióxido de azufre 53
c) Óxidos de nitrógeno 55
III.3. Los vegetales como indicadores del estrés ambiental 56
III.3.1. Introducción a la indicación con vegetales 56
III.3.2. Metodologías del uso de vegetales como indicadores del estrés ambiental 58
III.4. Sistemas antioxidantes 59
III.4.1. Antioxidantes no enzimáticos 60
a) Ácido L-ascórbico 60
b) Glutatión 64
c) α-Tocoferol 66
III.4.2. Antioxidantes enzimáticos 66

III.5. Determinación de ácido L-ascórbico en plantas 67
a) Preparación y conservación de las muestras 67
b) Técnicas analíticas 68
b.1) Volumetrías 68
b.2) Técnicas espectrofotométricas 69
b.3) Cromatografía líquida de alta resolución . 69
b.4) Cromatografía de gases 70
b.5) Electroforesis capilar 70
III.6. Determinación de glutatión en plantas 71
a) Preparación y conservación de muestras 71
b) Técnicas analíticas 72
b.1) Métodos enzimáticos 72
b.2) Cromatografía líquida de alta resolución . 72
b.3) Electroforesis capilar 73
III.7. Referencias 74

CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO Y DE ASCÓRBICO TOTAL EN PLANTAS VASCULARES Y NO VASCULARES POR ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL 85

IV.1. Introducción 88
IV.2. Parte experimental 90
IV.2.1. Reactivos 90
IV.2.2. Aparatos 91
IV.2.3. Material vegetal 91
IV.2.4. Tratamiento de muestras y reducción del DHA 92
IV.2.5. Procedimiento de CZE y enzimático 93

IV.3. Resultados y discusión 94
IV.3.1. Estudios preliminares 94
IV.3.2. Optimización de las condiciones de separación 96
IV.3.3. Aplicación a muestras reales, parámetros de calidad y validación 97
IV.4. Referencias 103

CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO, GLUTATIÓN Y SUS FORMAS OXIDADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL EN PLANTAS VASCULARES EXPUESTAS A LA ACCIÓN DEL OZONO 107

V.1. Introducción 110
V.2. Parte experimental 113
V.2.1. Reactivos 113
V.2.2. Aparatos 114
V.2.3. Material vegetal y experimentos de campo 114
V.2.4. Experimentos con sistema de fumigación de laboratorio 115
V.2.5. Preparación de las muestras para CZE 118
V.2.6. Procedimiento de CZE 118
V.3. Resultados y discusión 119
V.3.1. Estudios preliminares y de estabilidad 119
V.3.2. Parámetros de calidad con estándares y análisis de plantas 119
V.3.3. Perspectiva biológica 124
V.4. Referencias 128

PARTE B. DETECCIÓN Y CONTROL DE LA ADULTERACIÓN DE QUESOS NO BOVINOS CON LECHE DE VACA 133

CAPÍTULO VI. CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE Y EL QUESO 135

VI.1. Definición legal de la leche 137
VI.2. Propiedades físicas y físico-químicas de la leche 137
VI.3. Composición química 139
VI.3.1. Glúcidos 140
VI.3.2. Materia grasa 140
VI.3.3. Proteínas 141
a) Caseínas 141
b) Proteínas del suero 143
VI.3.4. Otros constituyentes 145
VI.4. Queso 146
VI.4.1. Definición de queso 146
VI.4.2. Elaboración del queso 146
VI.4.3. Clasificación 148
VI.5. Adulteraciones 149
VI.6. Técnicas de análisis de proteínas de la leche, queso y productos lácteos 150
VI.6.1. Técnicas de inmunoensayo 150
VI.6.2. Técnicas cromatográficas 151
VI.6.2.1. Cromatografía de intercambio iónico 151
a) Cromatografía de intercambio aniónico .. 151
b) Cromatografía de intercambio catiónico .. 151
VI.6.2.2. Cromatografía en fase inversa 152

VI.6.2.3. Otras cromatografías 153
a) Cromatografía de exclusión 153
b) Cromatografía hidrofóbica 154
c) Cromatografía de afinidad 154
VI.6.3. Técnicas electroforéticas 154
VI.6.3.1. Electroforesis en capa de gel 154
a) PAGE 155
b) SDS-PAGE 155
c) IEF 156
VI.6.3.2. Electroforesis capilar 156
VI.7. Referencias 162

CHAPTER VII. DETERMINATION OF COW'S MILK AND RIPENING TIME IN NON BOVINE CHEESE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF THE ETHANOL-WATER PROTEIN FRACTION 169

VII.1. Introduction 172
VII.2. Materials and methods 174
VII.2.1. Reagents 174
VII.2.2. Apparatus 174
VII.2.3. Origin and preparation of samples 174
VII.2.4. CZE procedures 175
VII.3. Statistical analysis 176
VII.3.1. Data exploratory analysis 176
VII.3.2. Linear discriminant analysis 177
VII.3.3. Partial least squares regression 177
VII.4. Results and discussion 178
VII.4.1. Definition of the variables and construction of the data matrix 178

VII.4.2. Exploratory data analysis by PCA 181
VII.4.3. Exploratory data analysis with dendrograms 183
VII.4.4. Linear discriminant analysis 184
VII.4.5. Constrution of PLS models 187
VII.4.6. Prediction of the cow's contents and ripening times by PLS 189
VII.5. Conclusions 191
VII.6. References 192

CHAPTER VIII. DETERMINATION OF COW'S MILK IN NONBOVINE AND MIXED CHEESES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF WHEY PROTEINS IN ACIDIC ISOELECTRIC BUFFERS 195

VIII.1. Introduction 198
VIII.2. Materials and methods 199
VIII.2.1. Reagents 199
VIII.2.2. Apparatus 200
VIII.2.3. Origin and preparation of samples 200
VIII.2.4. Recommended CZE procedures 201
VIII.3. Results and discussion 202
VIII.3.1. Separation of α-LAs of different animal origin 202
VIII.3.2. Separation of β-LGs of different animal origin 207
VIII.3.3. Quantitation studies 210
VIII.3.4. Figures of merit 214
VIII.3.5. Analysis of samples 217
VIII.4. Conclusions 218
VIII.5. References 219

PARTE C. CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS EN PRODUCTOS INDUSTRIALES 223

CAPÍTULO IX. CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS 225

IX.1. Tensioactivos 227
IX.1.1. Definición 227
IX.1.2. Clasificación 229
a) Tensioactivos aniónicos 229
b) Tensioactivos catiónicos 231
c) Tensioactivos no iónicos 233
d) Tensioactivos anfóteros 236
IX.1.3. Composición de productos industriales de limpieza ... 237
IX.2. Análisis de tensioactivos 240
IX.2.1. Precauciones en la toma y preparación de la muestra .. 240
IX.2.2. Extracción y preconcentración 241
IX.2.3. Técnicas de medida 242
IX.2.3.1. Volumetría 242
IX.2.3.2. Colorimetría 243
IX.2.3.3. Técnicas espectroscópicas 244
a) Espectroscopia ultravioleta 244
b) Espectroscopia infrarroja 245
c) Resonancia magnética nuclear 245
d) Absorción atómica 245
e) Espectroscopia de emisión de plasma acoplado por inducción 246
IX.2.3.4. Técnicas electroquímicas 246

IX.2.3.5. Técnicas cromatográficas 246
a) Cromatografía en capa fina 246
b) Cromatografía líquida de alta resolución . 247
c) Cromatografía de gases 248
d) Acoplamiento de masas a HPLC y GC ... 249
IX.2.3.6. Técnicas electroforéticas 249
a) Electroforesis en capa de gel 249
b) Electroforesis capilar 249
IX.3. Referencias 254

CAPÍTULO X. DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL Y CROMATOGRAFÍA MICELAR ELECTROCINÉTICA CON MICELAS DE DESOXICOLATO EN PRESENCIA DE ELEVADAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTE ORGÁNICO 263

X.1. Introducción 266
X.2. Parte experimental 268
X.2.1. Reactivos y muestras 268
X.2.2. Instrumentación 269
X.2.3. Procedimientos 269
X.3. Resultados y discusión 270
X.3.1. Estudios de CZE 270
X.3.2. Estudios de micelación y de MEKC en presencia de sales biliares 273
X.3.3. Comparación con otros disolventes y uso de otros aditivos 279
X.3.4. Parámetros analíticos significativos 281

X.3.5. Aplicación a muestras reales 282
X.4. Conclusiones 284
X.5. Referencias 285

CAPÍTULO XI. DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS ALQUILFENOL ETOXILADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA MICELAR ELECTROCINÉTICA CON SALES BILIARES 289

XI.1. Introducción 292
XI.2. Materiales y métodos 295
XI.2.1. Reactivos y muestras 295
XI.2.2. Instrumentación 296
XI.2.3. Procedimiento recomendado 296
XI.3. Resultados y discusión 297
XI.3.1. Estudios de optimización 297
a) Estudios MEKC con SDS 297
b) Estudios MEKC con sales biliares 299
XI.3.2. Análisis de muestras industriales 308
XI.4. Conclusiones 316
XI.5. Referencias 317

CAPÍTULO XII. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ALQUILBENCENO SULFONATOS LINEALES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL EN MEDIO NO ACUOSO Y EN PRESENCIA DE SALES DE ALQUILAMONIO 321

XII.1. Introducción 324

XII.2. Parte experimental 326
XII.2.1. Reactivos y muestras 326
XII.2.2. Instrumentación 326
XII.2.3. Procedimientos 327
XII.3. Resultados y discusión 327
XII.3.1. Selección del ácido y la amina 327
XII.3.2. Influencia de las concentraciones de ácido y amina ... 332
XII.3.3. Estudios realizados con mezclas etanol-acetonitrilo ... 337
XII.3.4. Parámetros analíticos significativos 338
XII.3.5. Aplicación a muestras reales 339
XII.4. Conclusiones 339
XII.5. Referencias 342

CAPÍTULO XIII. CONCLUSIONES GENERALES 345

ANEXOS 353

ANEXO I. ABREVIATURAS 355

ANEXOS II-VII. PUBLICACIONES 361

I. OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

CAPÍTULO I

OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

La experiencia del grupo en electroforesis capilar se inicia en 1994, con la estancia de larga duración de E. F. Simó en el laboratorio del Prof. P.G. Righetti de la Universidad de Milán. El Dr. E.F. Simó, realizó dos estancias en dicho laboratorio para trabajar en electroforesis capilar. La primera, de 4 meses de duración, se realizó dentro del marco de las becas otorgadas por la Generalitat Valenciana para formación de jóvenes investigadores, y la segunda, de un año de duración, se realizó a lo largo de 1995 en el marco del programa Europeo de Capital Humano y Movilidad. Como resultado de dicha estancia, el Dr. E.F. Simó publicó 6 artículos en revistas de alto impacto relacionados con la separación por electroforesis capilar de proteínas y fragmentos de ADN. Igualmente, el grupo ha organizado varios cursos de Tercer Ciclo o Posgrado sobre electroforesis capilar, impartidos en la Universitat de València a lo largo de varios años, si bien uno de ellos se impartió en Julio-Agosto de 1996 en la Universidad de Costa Rica (San José, Costa Rica) y también en la Universidad de Morelos (Cuernavaca, México) en el marco del Programa Intercampus Acción II por el Dr. G. Ramis.

A finales de 1994 y bajo el título: "Aplicaciones de la electroforesis capilar a la resolución de varios problemas de control de calidad" se inicia el proyecto IMPIVA 108994/1034, subvencionado por dicho organismo y por la empresa MERCADONA, S.A. en el marco del Programa de Proyectos de I+D Precompetitivos, y con una duración de dos años. Con fondos de dicho proyecto, en octubre de 1994 se adquiere un primer instrumento de electroforesis, y con fondos de la Generalitat Valenciana para dotación de infraestructuras, un segundo instrumento en enero de 1995. Desde entonces ambos instrumentos se han utilizado intensivamente en trabajos relacionados con: a) los objetivos del proyecto IMPIVA 108994/1034; b) los objetivos del proyecto GV/3205-95, en cooperación con un grupo de investigación en

Biología Vegetal; y c) durante los tres últimos años, al desarrollo de los objetivos planteados en tres convenios firmados con diversas empresas privadas, y actualmente vigentes.

Fruto de esta investigación son las numerosas publicaciones aparecidas en revistas internacionales de elevado impacto y las comunicaciones presentadas a congresos nacionales e internacionales.

El objeto de esta Memoria es la puesta a punto de métodos de análisis rápidos y fiables mediante electroforesis capilar dentro de las líneas de investigación del grupo. De hecho, los trabajos expuestos en esta Memoria están directamente relacionados con los objetivos de los proyectos y convenios citados.

De acuerdo con lo estipulado en la normativa sobre el Doctorado Europeo, parte de la Memoria está redactada en un idioma oficial de la Comunidad Europea distinto del castellano (Capítulos VII y VIII), adjuntándose en el anexo (anexos IV y V) la correspondiente traducción de dichos capítulos al castellano. Igualmente, se adjuntan como anexos las versiones en inglés del resto de los capítulos, y que corresponden a los artículos publicados.

Esta memoria consta de trece capítulos, siendo el segundo de ellos introductorio a la electroforesis capilar, y el resto se divide en tres grandes partes (A, B y C), constando cada una de ellas de sus respectivos capítulos introductorios (Parte A, Capítulo III; Parte B, Capítulo VI y Parte C; Capítulo IX) y de los que desarrollan objetivos de investigación específicos, tal como se concreta a continuación.

Parte A

Se han puesto a punto procedimientos de determinación de ácido L-ascórbico y glutatión en sus formas reducidas y oxidadas, por electroforesis capilar, en plantas vasculares y no vasculares, demostrándose la aplicabilidad de estos procedimientos a la evaluación de la calidad ambiental.

Parte B

Se han desarrollado procedimientos basados en la electroforesis capilar para la separación rápida y eficaz de proteínas en derivados lácteos. Los procedimientos se han aplicado al control de calidad de quesos, haciendo uso, cuando ha sido conveniente o necesario, de técnicas de estadística multivariante. El objetivo fue desarrollar procedimientos rápidos y fiables para detectar y cuantificar leche de vaca en quesos de oveja y de cabra, así como también el tiempo de maduración de quesos. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Pier Giorgio Righetti del *Dipartimento Scientifico e Tecnologico* de la *Università degli Studi di Verona.*

Parte C

Se han desarrollado procedimientos para determinar tensioactivos absorbentes en muestras de origen industrial, abarcando tensioactivos catiónicos, no iónicos y aniónicos. Se han propuesto métodos que permiten la resolución de tensioactivos catiónicos, en particular cloruro de benzalconio y cloruro de cetilpiridinio, frecuentemente utilizados en desinfectantes y productos de higiene personal. Asimismo, se han desarrollado otros dos métodos, uno de ellos para determinar tensioactivos no iónicos, y el otro para tensioactivos aniónicos.

El desarrollo de los objetivos expuestos anteriormente ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

1.- J.M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, V.I. Deltoro, A. Calatayud y G. Ramis-Ramos, "Determination of L-ascorbic acid and total ascorbic acid in vascular and non vascular plants by capillary zone electrophoresis", Analytical Biochemistry, 265, 275-281 (1998).

2.- J.M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, V.I. Deltoro, A. Calatayud, E. Barreno y G. Ramis-Ramos, "Simultaneous determination of L-ascorbic acid, glutathione and their oxidized forms in ozone-exposed vascular plants by capillary zone electrophoresis", Environmental Science and Technology, 34, 1331-1336 (2000).

3.- J.M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, C. Gelfi y P.G. Righetti, "Determination of cow's milk and ripening time in non-bovine cheese by capillary electrophoresis of the ethanol-water protein fraction", Electrophoresis, 21, 633-640 (2000).

4.- J.M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, C. Gelfi y P.G. Righetti, "Determination of cow's milk in pure and mixed cheeses by capillary electrophoresis of whey proteins in acidic isoelectric buffers", Journal of Chromatography A, 878, 261-271 (2000).

5.- J.M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso, C. Mongay-Fernández y G. Ramis-Ramos, "Determination of cationic surfactants by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with deoxycholate micelles in the presence of large organic solvent concentrations", Journal of Chromatography A, 895, 227-235 (2000).

6.- J.M. Herrero-Martínez, M. Fernández-Martí, E. F. Simó-Alfonso y G. Ramis-Ramos, "Determination of alkylphenol ethoxylates by micellar electrokinetic chromatography with bile salts", Electrophoresis (en prensa).

7.- J.M. Herrero-Martínez, E. F. Simó-Alfonso y G. Ramis-Ramos, "Separation and determination of linear alkylbenzenesulfonates by nonaqueous capillary electrophoresis in presence of alkylammoniun salts", enviado a Electroforesis.

II. ELECTROFORESIS CAPILAR

CAPÍTULO II

ELECTROFORESIS CAPILAR

II.1. Introducción a la electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE, *capillary electrophoresis*) es una técnica de separación que se basa en la migración diferencial de especies cargadas en presencia de un campo eléctrico [1-6]. En electroforesis capilar, la separación se lleva a término en el interior de capilares, generalmente entre 25 y 100 μm de diámetro interno, los cuales se han llenado con disolución tampón. La alta resistencia eléctrica del capilar permite aplicar voltajes altos (correspondientes a campos de entre 100 y 500 V/cm) con una mínima generación de calor, lo que reduce el tiempo de análisis y aumenta la eficacia. El calor generado es disipado con rapidez debido a la gran relación superficie/ volumen del capilar. La fuerza que impulsa el flujo en CE se genera en la misma pared interna del capilar mediante el efecto conocido como electroósmosis, lo que da lugar a un perfil plano del flujo. Se elimina así una de las causas del ensanchamiento del flujo cuando éste se genera externamente, como sucede en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *high-perfomance liquid chromatography*). En este caso el perfil del flujo es parabólico, constituyendo una causa de ensanchamiento de las bandas y pérdida de eficacia. Cuando el ensanchamiento de bandas es controlado exclusivamente por difusión, se obtienen picos que generalmente superan los 10^5 platos teóricos.

La primera separación electroforética en un tubo capilar, debida a Hjertén se publicó en 1967 [7]. Para evitar los efectos de convección, ya que el capilar era aproximadamente de 1 ml de capacidad, se aplicó una rotación en torno al eje longitudinal del mismo. Posteriormente, Virtenen [8] y Mikkers [9] desarrollaron separaciones electroforéticas en capilares de vidrio y PTFE respectivamente, con un

diámetro interno de aproximadamente 200 μm. En los primeros años de la década de los ochenta, Jorgenson y Lukacs [10] realizaron la separación en capilares de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno. Jorgenson [11] clarificó la teoría y describió las relaciones existentes entre los parámetros operacionales y la calidad de la separación, demostrando el gran potencial de la técnica como método analítico.

II.2. El mecanismo de separación en electroforesis capilar

La separación electroforética,como hemos comentado anteriormente, se basa en las distintas velocidades que adquieren los solutos cargados en el seno de un campo eléctrico. La velocidad de cada ion se puede expresar como:

$$v = \mu_e E \qquad (1)$$

donde v es la velocidad del ion, μ_e la movilidad electroforética y E el campo eléctrico aplicado. La movilidad electroforética, es una constante característica del ion en un determinado medio. Se puede hallar su valor a dilución infinita, ya sea por cálculo (corrección a cero) o por extrapolación de una serie de experimentos a diluciones crecientes del tampón. La movilidad viene determinada por un balance entre la fuerza electrostática F_e y las fuerzas de rozamiento F_f. La fuerza de atracción eléctrica se puede expresar como:

$$F_e = q E \qquad (2)$$

Si consideramos los iones como esferas de radio r, la fuerza de rozamiento viene dada por la ley de Stokes:

$$F_f = 6\pi\eta r v \qquad (3)$$

donde η es la viscosidad de la disolución. Una vez alcanzado el estado estacionario, en el que la velocidad es constante, ambas fuerzas son de la misma intensidad pero

de signo opuesto, por lo que:

$$qE = 6\pi\eta rv = 6\pi\eta r\mu_e E \quad (4)$$

de donde:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

De esta ecuación se deduce que las partículas con mayor densidad de carga tendrán movilidades mayores.

La movilidad electroforética teórica difiere generalmente de la observada experimentalmente. La movilidad medida en función del tiempo de migración se conoce como movilidad aparente o efectiva, siendo ésta la suma de las movilidades electroforética y electroosmótica, y a su vez presenta una relación intrínseca con el pH del medio y la composición del tampón empleado en la inyección. La diferencia entre movilidad absoluta y movilidad efectiva es debida al flujo electroosmótico.

II.3. El flujo electroosmótico

El flujo electroosmótico o electroendosmótico (EOF, *electroosmotic or electroendosmotic flow*) es uno de los principales factores que afectan a una separación electroforética. El EOF es debido a la presencia de cargas sobre la superficie de la pared interna del capilar, y al efecto que produce la aplicación del campo eléctrico sobre la disolución en contacto con dicha pared cargada. En contacto con un medio acuoso, la superficie del capilar tiene generalmente un exceso de cargas negativas a causa de la ionización de la superficie por sí misma, y/o por adsorción de especies aniónicas sobre ella. Para capilares de sílice fundida ocurren los dos procesos, aunque se puede controlar el EOF reduciendo o aumentando el número de grupos silanoles en forma aniónica. Así el flujo electroosmótico es prácticamente nulo por debajo de pH

3, al estar todos los silanoles protonados. Por contra, al aumentar el pH aumenta el EOF. En capilares de materiales no aniónicos como el PTFE, también se presenta este fenómeno, siendo debido a la adsorción de aniones sobre sus paredes.

Los iones que se encuentran en la disolución tienden a neutralizar la superficie del capilar, formando una doble capa y creando una diferencia de potencial conocida como potencial zeta. La primera capa, o capa de adsorción primaria, está fuertemente retenida, pero sobre ella se establece una capa difusa en la que predominan los iones del signo contrario al potencial de la superficie. Esta segunda capa está menos retenida, por lo que puede moverse por aplicación de una diferencia de potencial. Su movimiento arrastra a todo el líquido. Una representación esquemática de este fenómeno se puede observar en la Figura II.1.

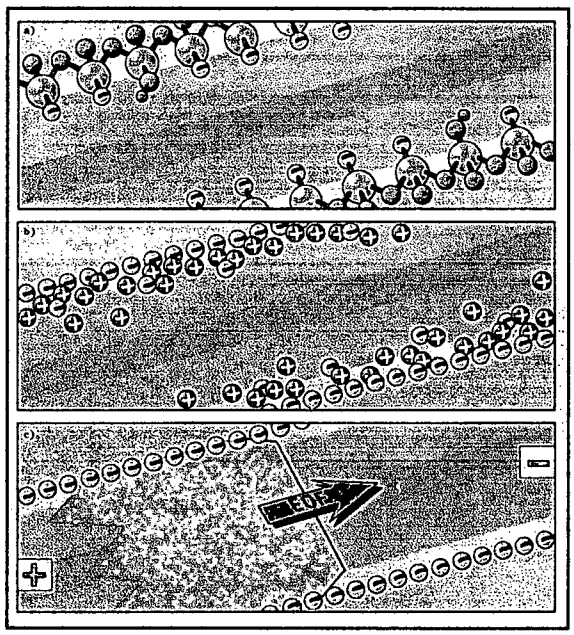


Figura II.1. Desarrollo del flujo electroosmótico: a) carga negativa sobre la superficie de sílice fundida; b) cationes hidratados acumulados sobre la superficie; c) flujo hacia el cátodo por la aplicación de campo eléctrico.

La magnitud del flujo electroosmótico se puede expresar en función de los términos de velocidad o de movilidad

$$v_{EOF} = (\varepsilon\zeta/\eta)E \quad (6)$$

o bien:

$$\mu_{EOF} = (\varepsilon\zeta/\eta) \quad (7)$$

donde v_{EOF} es la velocidad del flujo electroosmótico, μ_{EOF} es la movilidad electroosmótica, ζ es el potencial zhita o zeta y ε es la constante dieléctrica del medio. La μ_{EOF} depende de la naturaleza de la pared del capilar y de la composición del medio. El potencial zeta es función de la carga por unidad de superficie, y no sólo depende del pH, sino también de la fuerza iónica del tampón. Así por ejemplo, un aumento en la misma provoca una disminución del espesor de la doble capa, una disminución del potencial zeta y, subsiguientemente, una reducción del flujo. La velocidad total de las partículas cargadas es la suma de su velocidad electroforética y de la velocidad electroosmótica:

$$v = v_e + v_{EOF} \quad (8)$$

En la mayoría de las aplicaciones de la electroforesis capilar la v_{EOF} es mayor que la v_e. En la forma más habitual de trabajo, todas las partículas tanto cationes como aniones y partículas sin carga se mueven en la misma dirección, siendo arrastradas hacia el cátodo; por tanto el flujo es del ánodo al cátodo. Como resultado de la suma de las dos movilidades, los cationes avanzan más rápidamente que el flujo, las moléculas neutras avanzan a la misma velocidad del EOF y los aniones se retrasan, tanto más cuanto mayor es su densidad de carga (Figura II.2).

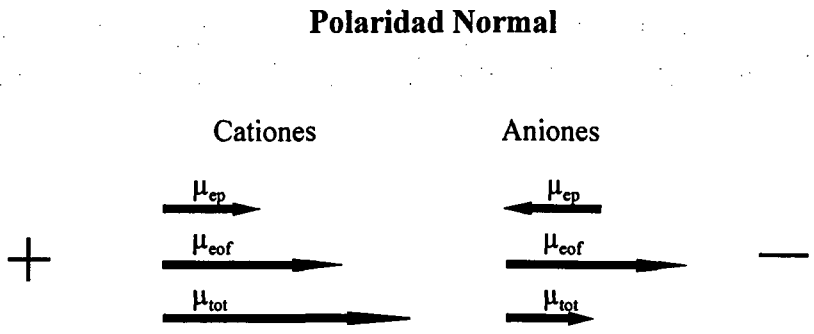


Figura II.2. Movilidad electroforética total para cationes y aniones.

El control del EOF requiere alterar la carga de la superficie del capilar o la viscosidad del tampón. En la Tabla II.1 se indican muchos de los métodos para control del EOF.

Una forma rápida de disminuir el EOF es la disminución del campo eléctrico, lo que conlleva numerosas desventajas en cuanto al aumento del tiempo de análisis, y pérdida de eficacia y de resolución. Los cambios más drásticos en el EOF son logrados alterando el pH del tampón, pero ello puede afectar la carga del soluto y su movilidad. El EOF puede ser modificado ajustando la concentración o fuerza iónica del tampón, pero elevadas concentraciones del mismo pueden generar corriente elevada y calentamiento por efecto Joule. También se puede controlar el EOF modificando la pared del capilar, a través de revestimientos dinámicos, esto es, mediante compuestos retenidos por adsorción, o también con revestimientos estáticos, esto es, enlazados covalentemente a la superficie.

Tabla II.1. Métodos de control del flujo electroosmótico.

Variable	Resultado	Comentario
Campo eléctrico	Cambio proporcional en el EOF	-Al reducirse pueden disminuir la eficacia y la resolución -Calentamiento por efecto Joule a campos elevados
pH del tampón	EOF disminuye a pH bajo y aumenta a pH alto	- Efecto importante sobre el EOF - Puede alterar la carga y/o estructura del soluto
Fuerza iónica o concentración del tampón	Un aumento provoca disminución del potencial zeta y del EOF	- Elevada fuerza iónica genera corriente elevada y calentamiento - Baja fuerza iónica crea adsorción de la muestra -Distorsión de los picos si la conductividad es diferente a la de la muestra - Limita el hacinamiento de la muestra si se disminuye
Temperatura	Cambia la viscosidad un 2-3% por °C.	-Es útil si la T^a se controla instrumentalmente
Modificador orgánico	Cambia potencial zeta y viscosidad	-Cambios complejos -Puede alterar la selectividad
Tensioactivo	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofílicas y/o iónicas	-Alteran significativamente la selectividad -Tensioactivos aniónicos aumentan el EOF -Tensioactivos catiónicos pueden disminuir o invertir el EOF
Polímero hidrofílico	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofóbicas	-Disminuye EOF por apantallamiento de la carga de la superficie y aumento de la viscosidad
Polímero policatiónico	Se adsorbe a la pared del capilar vía interacciones hidrofóbicas y electrostáticas	-Eficaz a concentraciones muy bajas
Revestimiento covalente	Enlace químico a la pared del capilar	- Múltiples modificaciones posibles (hidrofilia o carga) - Problemas de estabilidad del recubrimiento

II.4. Movilidad y tiempo de migración

El tiempo que un soluto necesita para migrar desde el punto de inyección hasta el punto de detección se denomina tiempo de migración. Éste se puede relacionar con una serie de parámetros experimentales a través de:

$$\mu_a = \frac{l}{tE} = \frac{lL}{tV} \qquad (9)$$

donde μ_a es la movilidad aparente o total, que corresponde a la suma de las movilidades electroforética y electroosmótica, V es el voltaje aplicado, l es la longitud efectiva del capilar, considerada como la distancia entre el extremo donde se realiza la inyección y la ventana de detección, L es la longitud total del capilar, t es el tiempo de migración y E es el campo eléctrico. En presencia del flujo electroosmótico la movilidad medida corresponde a la movilidad aparente. El EOF se puede medir inyectando una especie sin carga que no se adsorba, para lo cual suelen utilizarse, entre otros compuestos, acetona, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y óxido de mesitilo.

II.5. Dispersión de zona controlada por difusión

La dispersión puede ser definida como ensanchamiento de las zonas de los solutos provocada por diferencias en la velocidad del soluto dentro de esa zona. De ahí que la separación electroforética dependa de las diferencias entre las movilidades de los solutos. La diferencia necesaria para resolver dos zonas es función de la longitud de las zonas, y estas últimas dependen fuertemente del proceso de dispersión. De los dos tipos de dispersión posible, longitudinal y radial, solo la dispersión longitudinal tiene influencia, ya que la segunda está anulada por la geometría del capilar.

La situación de dispersión mínima o dispersión óptima ideal se tiene cuando otros mecanismos de dispersión distintos de la difusión molecular longitudinal son despreciables.

En tal caso, la dispersión viene controlada por la difusión molecular y se puede expresar como:

$$\sigma^2 = 2Dt = \frac{2DlL}{\mu_a V} \qquad (10)$$

donde σ es la desviación estándar del pico, y D es el coeficiente de difusión o difusibilidad. El número de platos teóricos, N, cuando la dispersión está controlada por difusión molecular, viene dado por:

$$N = \frac{l^2}{\sigma^2} = \frac{\mu_a V l}{2DL} = \frac{\mu_a E l}{2D} \qquad (11)$$

que indica que la eficacia es proporcional a las movilidades y al voltaje aplicado, inversamente proporcional a la difusibilidad e independiente de la longitud del capilar.

Algunos de los factores más importantes que influyen en la eficacia son los gradientes de temperatura inducidos por calentamiento Joule, por la longitud de la muestra inyectada y por las interacciones del soluto con las paredes del capilar.

II.6. Interacciones soluto-pared

Las interacciones entre el soluto y la pared del capilar van en detrimento de la eficacia. Dependiendo de la intensidad de la interacción, puede suceder que el pico del soluto arrastre una cola considerable, o incluso que no aparezca por estar completamente adsorbido. Las principales causas de la adsorción sobre las paredes de sílice fundida es la interacción iónica entre los solutos catiónicos y las paredes aniónicas, y las interacciones hidrofóbicas y en algunos casos también a la formación de esteres de los silanoles. Así pues, la gran relación área de la pared-volumen del capilar, es beneficiosa para el transporte de calor que se genera en el interior del capilar por efecto Joule, pero representa un inconveniente por el aumento de los fenómenos de adsorción.

Fenómenos de adsorción significativos se pueden observar para solutos como péptidos de alto peso molecular y proteínas, ya que estas especies tienen numerosas cargas y una hidrofobicidad media. Algunas estrategias destinadas a reducir las interacciones soluto-pared son: aumento de la concentración del tampón (disminuye las interacciones del soluto al reducir la carga efectiva de la superficie), operar a valores de pH extremos con el fin de limitar la adsorción (pH ácidos como 2-3 o básicos como 9-10), o recubrimiento estático o dinámico de la pared del capilar.

II.7. Resolución

La resolución entre los componentes de una muestra es el objetivo final de una técnica de separación. En CE, la resolución se define del mismo modo que en cromatografía, como la diferencia entre los máximos de los dos picos considerados dividida por el promedio de sus anchuras:

$$R = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2} = \frac{t_2 - t_1}{4\sigma} \qquad (12)$$

donde t es el tiempo de migración, w_1 y w_2 son las anchuras de las bases de los picos y 4σ es la anchura promedio. Por otra parte, la resolución depende de las movilidades electroforéticas y electroosmótica, y de otros parámetros, del modo siguiente:

$$R = \left(\frac{1}{4\sqrt{2}}\right)(\Delta\mu)\left(\frac{V}{D\ (\mu + \mu_{EOF})}\right)^{1/2} \qquad (13)$$

donde $\mu = (\mu_2 + \mu_1)/2$ y $\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$.

A diferencia de lo que sucedía con la eficacia (ecuación 11), un aumento del voltaje no provoca un aumento equivalente de resolución, ya que la relación está mediada por una raíz cuadrada. Es necesario aumentar cuatro veces el voltaje para obtener un aumento del doble en la resolución. Por otro lado, para un soluto tal que $\mu = -\mu_{EOF}$ la resolución es infinita, pero dicho soluto no llega a alcanzar nunca el detector. Por tanto, la resolución en CE es inversamente proporcional al tiempo de análisis.

II.8. Modificaciones en la pared del capilar

Para reducir la adsorción, entre otros medios indicados anteriormente, puede recurrirse a modificar la pared del capilar. Existen dos tipos de revestimientos: a) permanentes, basados en fases enlazadas covalentemente o adheridas físicamente; b) dinámicos, basados en la adición de determinados reactivos al tampón.

a) Revestimientos permanentes

La sililación seguida por desactivación con un grupo funcional adecuado o funcionalización es el método más extensamente usado. La desactivación se puede conseguir con especies tales como poliacrilamida, polisacáridos, etc. Dependiendo de la desactivación, se puede eliminar o invertir el EOF. En la Tabla II.2 se indican algunos métodos. Estas modificaciones de la pared han sido diseñadas como permanentes y no requieren apenas mantenimiento, pero desafortunadamente la estabilidad de los recubrimientos es siempre limitada y con frecuencia difícil de reproducir.

b) Revestimientos dinámicos

Una ventaja de los recubrimientos dinámicos es su reproducibilidad y estabilidad. Como el modificador se encuentra en el tampón, el revestimiento se regenera continuamente.

Una desventaja es que los solutos también pueden ver afectados por la presencia del modificador. Otra limitación es el mayor tiempo de equilibración necesario para obtener una superficie reproducible y un EOF constante. En la Tabla II.3 se contemplan algunos modos de desactivación dinámica.

Tabla II.2. Tipos de recubrimientos estáticos.

Tipos	Comentarios
Sililación y funcionalización (Si-O-Si-R[a])	- Numerosos grupos funcionales utilizables - Preparación sencilla - Enlace Si-O-Si estable entre pH 4 y 7. - Amplia estabilidad térmica
Acoplamiento directo Si-C (Poliacrilamida vía Grignard)	- No es necesaria la sililación - Estable entre pH 2 y 10 - Dificultad de preparación
Polímeros adsorbidos (Celulosa, PEG[b], PVA[c])	- Poca estabilidad térmica - Intervalo de pH 2 a 9 - Relativamente hidrofóbico
Polímeros entrecruzados adsorbidos (Polietilenoimina)	- Invierte el EOF - Utilizable para proteínas básicas - Estable a pH fisiológico
Fases de Cromat. de gases	- Inestable frente a la hidrólisis
Fases de Cromat. líquida	- Pueden aumentar la adsorción de proteínas

[a]R = Poliacrilamida, proteínas o aminoácidos, ácidos sulfónicos, maltosa, PEG[b]

[b]PEG = polietilenglicol

[c]PVA = alcohol polivinílico

Tabla II.3. Tipos de recubrimientos dinámicos

Tipos	Comentario
Extremos de pH	- Reduce la interacción electrostática - Intervalo de pH de 2 a 12 - EOF casi eliminado a pH bajo - EOF rápido a pH alto - Puede desnaturalizar proteínas
Fuerza iónica alta	- Reduce la interacción electrostática - Disminuye el EOF - Posible calentamiento Joule
Polímeros hidrofílicos	- Enmascara la carga de la pared y reduce el EOF - Aumenta la viscosidad - Puede separar por tamaños
Tensioactivos	- Desactivan la superficie del capilar a través de interacciones hidrofóbicas y/o iónicas - Amplia variedad de aditivos - Fáciles de usar - Posibilidad de usar el mecanismo de separación de Cromat. micelar electrocinética - Puede disminuir o invertir el EOF - Puede desnaturalizar irreversiblemente proteínas - Pueden ser usados en conjunción con fases de Cromat. líquida
Aminas cuaternarias	- Disminuye o invierte el EOF - Pueden formar pares iónicos
Polímeros policatiónicos	- Neutraliza la carga de la pared reduciendo, eliminando o invirtiendo el EOF - Efectivo a concentraciones muy bajas

II.9. Modos de operación en electroforesis capilar

Una característica importante de la electroforesis capilar es la gran versatilidad en las formas de operación. Se pueden distinguir seis modos de operación que corresponden a otros tantos mecanismos de separación: electroforesis capilar zonal, cromatografía capilar micelar electrocinética, electroforesis capilar en gel, isoelectroenfoque, isotacoforesis y electrocromatografía capilar. A su vez, estos pueden combinarse para dar lugar a mecanismo de separación mixtos.

II.9.1. Electroforesis capilar zonal

La electroforesis capilar zonal (CZE, *capillary zone electrophoresis*) es la técnica más ampliamente empleada debido a su simplicidad y su versatilidad. El capilar se llena sólo con el tampón, y es en este medio donde tiene lugar la separación; ésta tiene lugar gracias a las diferentes movilidades electroforéticas de los solutos. Como se indica en la Figura II.3, la separación se basa en la migración de solutos en bandas discretas y a diferentes velocidades. En presencia de un EOF elevado es posible la separación y detección tanto de solutos aniónicos como catiónicos en la misma inyección.

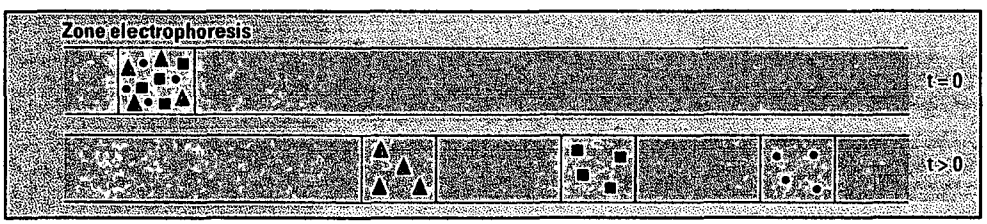


Figura II.3. Esquema de separación en CZE.

a) Selección del tampón en CZE

La selección del tampón que hace las veces de electrolito de fondo (BGE, *background electrolyte*) o de soporte de la corriente, es extremadamente importante. La sensibilidad del flujo electroosmótico frente al pH hace imprescindible el estricto control de la composición del tampón. Los tampones formados por ácidos poliprotónicos como el citrato o fosfato, tienen la ventaja de que pueden ser efectivos en un amplio intervalo de pH.

Los tampones utilizados en electroforesis capilar deben cumplir las siguientes condiciones:

i) buena capacidad amortiguadora en el intervalo de pH requerido,

ii) baja absorbancia a la longitud de onda de detección,

iii) baja movilidad electroforética para minimizar la generación de corriente.

La composición de un tampón electroforético determina la migración de las especies presentes en la muestra, debiendo garantizar la estabilidad del sistema en su conjunto, el comportamiento reproducible de los solutos individuales y la separación satisfactoria de los componentes de la muestra.

Los llamados tampones biológicos (Tris, borato, histidina, etc.) son especialmente recomendables por su baja movilidad electroforética, por lo que pueden ser utilizados en alta concentración sin que ello implique un aumento significativo en la corriente. Una desventaja de algunos de estos tampones es su elevada absorbancia en la región UV-vis. Algunos de ellos pueden ser utilizados para formar complejos con los solutos y alterar la selectividad, como por ejemplo, el borato ha sido utilizado para aumentar la separación de catecoles y carbohidratos [12].

b) Tampones isoeléctricos

Tradicionalmente para la separación de péptidos o proteínas se han usado tampones como fosfato, formato y glicinato en medio ácido, con algunas ventajas respecto a los medios neutro o alcalino [13]:

i) Su disociación se minimiza de forma significativa, anulándose prácticamente el EOF para cualquier pH por debajo del pK del silanol (evaluado como pK = 6.3), aunque la "neutralización" de la pared se completa por debajo de pH 2.3 [14] .

ii) El bajo valor de pH en el medio comunica una carga positiva neta al péptido o proteína, permitiendo así una mejor migración hacia el extremo catódico del capilar.

iii) Como la pared del capilar prácticamente no tiene carga, no existe interacción apreciable entre ella y el péptido, disminuyendo la causa mayoritaria de ensanchamiento de picos [15, 16].

El problema estriba en que en un medio tan ácido (pH 2-2.5) la conductividad del tampón es muy elevada, y únicamente se puede trabajar con voltajes muy bajos (E < 200 V/cm), de forma que se alarga demasiado el tiempo de análisis y se pierde resolución.

Para soslayar este problema se introdujeron los tampones isoeléctricos, que han resultado ser electrolitos muy útiles para las separaciones por electroforesis capilar, especialmente de péptidos y proteínas [17]. Se basan en especies químicas que combinan una alta capacidad amortiguadora en la zona de pH de interés, presentando al mismo tiempo una baja conductividad.

La ventaja de trabajar en electroforesis con un tampón isoeléctrico, en un medio cuya acidez se encuentra próxima a su pI es que se puede aumentar el voltaje sin que se incremente el efecto Joule. Con ello se mejora la resolución y se reduce el tiempo de análisis.

Cuando se usa un tampón anfótero en medio acuoso perteneciente a un sistema diprótico $H_2A^{z+2}/HA^{z+1}/A^z$ ($\log K_1$, $\log K_2$), la capacidad amortiguadora, β, vendrá dada por:

$$\beta = 2.303 \times \left[h + \frac{K_w}{h} + C_s h \times \frac{\beta_1 + 4\beta_2\, h + \beta_1 \beta_2\, h^2}{P(h)^2} \right] \qquad (14)$$

siendo C_s la concentración analítica del sistema, $\beta_1 = K_1$, $\beta_2 = K_1 K_2$, siendo K_1 y K_2 las constantes de protonación y donde, para abreviar, se hace $P(h)=1+\beta_1 h+\beta_2 h^2$.

El estudio de esta función conduce a la siguiente conclusión: el empleo de un anfolito con valores próximos de $\log K_i$, pero distanciados al menos en 1.2 unidades logarítmicas ($\Delta \log Ki > 1.2$), tiene la ventaja de que la capacidad amortiguadora presenta una pseudo-meseta, lo que permite ensanchar el intervalo útil de amortiguado manteniendo baja la concentración del electrolito, y con ella la conductividad.

Por su parte la conductividad estará también en función de las conductividades iónicas equivalentes de las especies que tengan una carga neta no nula y de sus concentraciones respectivas. En el caso del anfolito que se considera, la conductividad vendrá dada por:

$$\chi = \lambda_{H^+}[H^+] + \lambda_{OH^-}[OH^-] + C_s \frac{z\lambda_A + (z+1)\lambda_{HA}\beta_1 h + (z+2)\lambda_{H_2A}\beta_2 h^2}{P(h)} \qquad (15)$$

La característica que mejor define un tampón electroforético es la relación entre la capacidad amortiguadora y la conductividad, $R = \beta/\chi$ [18]. Cuanto más alta sea la primera y más baja la segunda, esto es, cuanto mayor sea R para el valor de pH de trabajo, tanto más adecuado será el electrolito para su trabajo en electroforesis capilar.

Las conductividades iónicas de H^+ y de OH^- son del orden de 350 y de 192 S x cm^2 x eq^{-1}, valores muy superiores a las de los restantes iones y que, por ello, se empiezan a dejar sentir, y prácticamente se imponen, por debajo de pH 3 y por encima

de pH 11. Por ello, la acción de los tampones isoeléctricos está limitada a la región 3<pH<11.

c) Aditivos modificadores de la selectividad en CZE

La selectividad en la separación puede ser fácilmente alterada mediante cambios en la naturaleza del BGE que incluyen el control del pH y de la naturaleza de los iones del tampón, así como también el uso de diversos aditivos, tales como iones dobles, polímeros lineales, disolventes orgánicos miscibles, selectores quirales, iones metálicos, agentes solubilizantes por rotura de puentes de hidrógeno, agentes formadores de pares de iones, etc. En la Tabla II.4 se muestra una selección de aditivos.

Tabla II.4. Algunos aditivos habituales en CZE.

Aditivo	Ejemplo	Efectos
Disolventes orgánicos	Metanol, acetonitrilo	Alteran el EOF y la hidrofobicidad
Iones dobles	Tris, CHAPS[a]	Aumentan la fuerza iónica sin aumentar la conductividad
Selectores quirales	Ciclodextrinas, éteres corona	Quiralidad y solubilización
Aminas y poliaminas	Diaminopentano, putrescina, polibreno	Pares iónicos, inversión de EOF
Formadores de puentes de hidrógeno	Urea	Solubilización

[a]3-[3-(cloroamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato

II.9.2. Cromatografía micelar electrocinética

La cromatografía capilar micelar electrocinética o MEKC (*micellar electrokinetic chromatography*) fue introducida en 1984 por Terabe y col. [19-22], y es una de las formas de electroforesis más ampliamente utilizadas. Es la única técnica electroforética que se puede utilizar para la separación de especies sin carga eléctrica neta, si bien es capaz de separar también solutos cargados. Se basa en las diferencias de las constantes de asociación entre solutos y micelas. La separación de especies neutras en MEKC tiene lugar en un tampón que contiene tensioactivos iónicos a concentraciones superiores a su concentración micelar crítica (CMC, *critical micelle concentration*). Tanto las micelas como los iones libres del tensioactivo iónico pueden migrar a favor o en contra del EOF, dependiendo de su carga y del signo del potencial zeta de la pared del capilar. Durante su migración, las micelas interaccionan con los solutos de una forma cromatográfica, tanto por interacciones hidrofóbicas como por interacciones electrostáticas. Las especies no cargadas que interaccionan con la micela modifican su movilidad, distinguiéndose del flujo electroosmótico, y las que no interaccionan se mueven con el EOF. El proceso de separación se esquematiza en la Figura II.4.

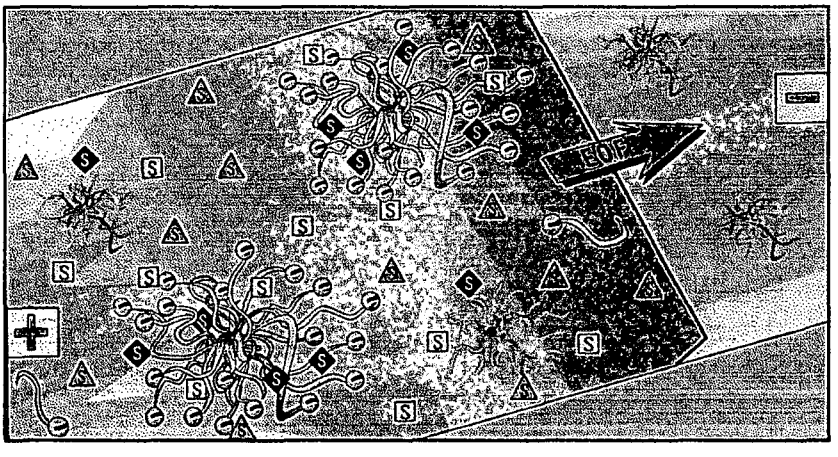


Figura II.4. Esquema del mecanismo de separación en MEKC.

Con flujo no invertido, los tensioactivos aniónicos, como el dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium dodecyl sulphate*) migran hacia el ánodo, es decir, en dirección opuesta al EOF. Si la polaridad es positiva, es necesario un EOF muy elevado para que las micelas lleguen a moverse en la dirección del cátodo, alcanzando el detector. Generalmente se utilizan valores elevados del pH para mantener un valor de EOF razonable, y así asegurar la migración de los solutos asociados a las micelas de SDS hacia el detector.

El mecanismo de separación de solutos neutros en MEKC es esencialmente cromatográfico, y puede ser descrito utilizando una ecuación cromatográfica modificada. La relación del número total de moles de un determinado soluto en la pseudofase estacionaria (micela), y el número de moles del mismo soluto que se encuentra en la pseudofase móvil (tampón electroforético), o retención relativa de ese soluto, k, vendrá dado por:

$$k = \frac{t_m - t_0}{t_0(1 - \frac{t_m}{t_{mc}})} = K\frac{V_S}{V_M} \qquad (16)$$

donde: t_m = tiempo de migración del soluto

t_0 = tiempo de migración de los solutos no retenidos

t_{mc} = tiempo de migración de las micelas

K = constante de distribución del soluto fase móvil-micela

V_S = volumen de la pseudofase micelar o pseudo estacionaria

V_M = volumen de la pseudofase móvil

Cuando el tiempo de migración de la micela, t_{mc}, es infinito, esto es, cuando las micelas se comportan como una fase estacionaria estática, no llegando al detector, esta ecuación se reduce a la definición convencional de k. La retención relativa se puede modificar variando la concentración de tensioactivo y la polaridad de la pseudofase continua. Generalmente, la retención relativa, aumenta linealmente con la concentración de tensioactivo, y disminuye si se incrementa la hidrofobicidad de la pseudofase continua. El uso de tensioactivos iónicos a elevada concentración está limitado por el aumento de corriente producido, y por el efecto Joule asociado a la misma.

La resolución de dos especies en MEKC se puede describir mediante la ecuación siguiente:

$$R = \frac{N^{1/2}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k_2}{k_2 + 1}\right)\left(\frac{1 - \frac{t_0}{t_{mc}}}{1 + \frac{t_0}{t_{mc}} k_1}\right) \qquad (17)$$

donde los subíndices 1 y 2 se refieren a las dos especies que se consideran, y donde α es la selectividad: $\alpha = k_2 / k_1$.

Esta ecuación establece la relación entre eficacia y resolución, y entre eficacia y selectividad. La ecuación predice una mejora de la resolución al aumentar la eficacia o la selectividad. La resolución aumenta si aumentamos la ventana de tiempo de elución o tiempo de análisis, esto es, el intervalo de tiempo definido por la diferencia ($t_{mc} - t_o$). Los solutos hidrofílicos que no interaccionan con la micela son eluidos con el flujo electroosmótico, y los solutos totalmente retenidos por la micelas, como es el caso del Sudán III, utilizado con frecuencia para establecer t_{mc}, eluyen con las mismas.

a) Selección del tensioactivo

En MEKC se pueden conseguir variaciones muy importantes de la selectividad variando la naturaleza física de la micela: tamaño, carga, geometría, polaridad e hidrofobicidad. Para ello pueden emplearse diferentes tensioactivos por separado o en mezclas. La selectividad varía de modo similar a lo que sucede cuando se cambia la fase estacionaria en cromatografía líquida. Los tensioactivos pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos, iones dobles, o mezclas de ellos. En la Tabla II.5 se indican algunos tensioactivos habitualmente utilizados en MEKC. A su vez, dentro de cada categoría, también se puede variar tanto la longitud de la cadena alquílica como la estructura y carga del grupo hidrofílico.

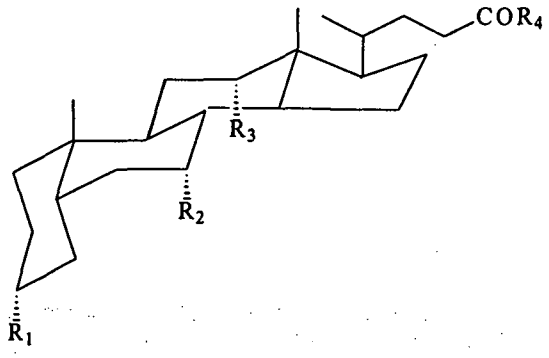
Tabla II.5. Tensioactivos habitualmente empleados en MEKC [23-25].

Tensioactivo	CMC [a] (mM)	Núm. agreg.
Aniónico		
Dodecil sulfato sódico	8.1	62
Catiónico		
Bromuro de cetiltrimetilamonio	0.92	61
Bromuro de dodeciltrimetilamonio	15	56
Bromuro de tetradeciltrimetilamonio	3.5	75
No iónico		
Octil glucósido	---	---
n-Dodecil-β-D-maltósido	0.16	---
Triton X-100	0.24	140
Tween 20	0.95	---
Brij 35	0.09	40
Ion doble		
CHAPS[a]	8	10
Sales biliares		
Colato sódico	13-15	2-4
Desoxicolato sódico	4-6	4-10
Taurocolato sódico	10-15	5

[a] 25°C

b) Sales biliares

Otros tensioactivos aniónicos, menos utilizados que el SDS, son las sales biliares. Estas tienen la estructura grande, rígida y no lineal de los esteroides (Figura II.5). Las sales biliares suelen tener números de agregación más bajos que los tensioactivos alifáticos convencionales (veáse Tabla II.5).



Sal biliar	R_1	R_2	R_3	R_4
Colato sódico	OH	OH	OH	ONa
Desoxicolato sódico	OH	H	OH	ONa
Taurocolato sódico	OH	OH	OH	$NHCH_2CH_2SO_3Na$
Taurodesoxicolato sódico	OH	H	OH	$NHCH_2CH_2SO_3Na$

Figura II.5. Estructuras de las sales biliares.

Las propiedades físicas de las sales biliares han sido ampliamente estudiadas [26, 27], mientras que existe cierta controversia acerca de la estructura de sus micelas. En 1968, Small [28] propusó un modelo de agregación de las sales biliares según el cual las micelas de la capa primaria se forman por asociación de los esqueletos hidrocarbonados, y las micelas secundarias por agregación de las primarias. En las micelas primarias, hasta 10 moléculas de la sal biliar se enlazan por las cadenas hidrofóbicas, mientras que los grupos hidrofílicos salientes (grupos hidroxilo y carboxílico) están fuertemente hidratados. Este modelo fue establecido en base a criterios de máxima ocupación del espacio y del comportamiento interfacial de los monómeros.

Posteriores estudios de agregación de las sales biliares mediante técnicas de dispersión de la luz [29, 30], resonancia magnética nuclear, resonancia de espín electrónico y técnicas de rayos X [31-34] apoyan el modelo original de Small. Como resultado de dichos estudios, se ha propuesto un modelo en el que los agregados en cuestión forman micelas en forma de hélice (Figura II.6), en las cuales los grupos hidroxilo se orientan hacia el centro de la micela, mientras que los grupos metilo se quedan en la superficie de la hélice. Al contrario, que en una micela clásica, la parte interior es polar y la parte exterior es apolar. Así pues, la micela de la sal biliar puede ser considerada o vista como una "micela invertida".

Este modelo puede ser importante para comprender el reconocimiento quiral por parte de las micelas formadas por sales biliares. El número y orientación de grupos hidroxilo cambiará las posibilidades de interacción quiral de los solutos con las sales biliares. A su vez, el hecho de que el monómero de sal biliar sea mas polar que el SDS conduce a una reducción general de k en MEKC [35, 36], lo cual es particularmente ventajoso en el caso de separaciones de compuestos muy hidrofóbicos.

Ademas, las micelas de sal biliar pueden tolerar altas concentraciones de disolvente orgánico, como por ejemplo metanol [37], sin experimentar una pérdida de eficacia o un aumento excesivo del tiempo de análisis. Estas deseables características, junto con su mencionada inherente quiralidad, ha impulsado el uso de sales biliares en MEKC [37-40].

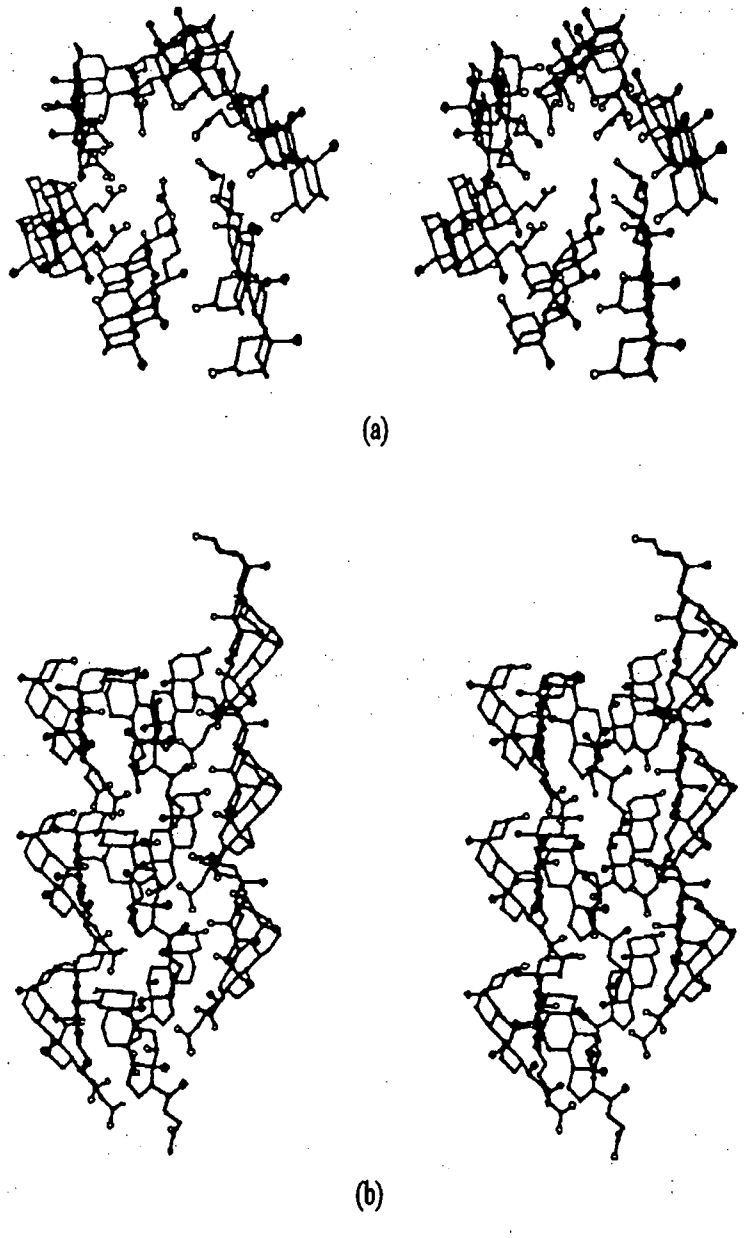


Figura II.6. Micelas de desoxicolato de rubidio: (a) proyección a lo largo y (b) perpendicular al eje de la hélice. Los círculos negros son grupos metilo, y los blancos grupos hidroxilo. Se han omitido las moléculas de agua y los iones Rb^+.

c) Aditivos en MEKC

De forma análoga a como sucede en cromatografía líquida con fases móviles micelares, el uso de los aditivos citados anteriormente permite modificar la selectividad. Así por ejemplo, la adición de disolventes orgánicos tales como metanol o acetonitrilo, en concentraciones de 10-20%, modifica la selectividad al tiempo que aumenta la solubilidad de los compuestos orgánicos en la fase acuosa, pero concentraciones superiores rompen la estructura micelar del tensioactivo y provocan un deterioro de la separación.

II.9.3. Electroforesis capilar en gel

La electroforesis capilar en gel (CGE, *capillary gel electrophoresis*) ha sido empleada principalmente en las ciencias biológicas, para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. En CGE, los solutos migran a través de los poros de un polímero o gel que actúa como un tamiz molecular, separando los solutos en función de su tamaño y forma.

Sustancias como el ADN y proteínas saturadas con SDS no se pueden separar con otras técnicas electroforéticas, debido a que presentan relaciones masa-carga constantes, por lo que todas ellas migrarían a la misma velocidad. Por ejemplo, en la molécula de ADN, cada nuevo nucleótido adicionado a una cadena da lugar a una nueva unidad de masa, pero al mismo tiempo a una nueva carga, de manera que la relación masa-carga permanece constante.

La electroforesis capilar en gel se puede comparar directamente con la electroforesis en capa de gel, ya que los mecanismos que tienen lugar en ambas técnicas son fundamentalmente los mismos, con la diferencia de que el soporte capilar es más versátil, puesto que no es necesario que el gel tenga consistencia mecánica.

En la separación de fragmentos de ADN, se utilizan polímeros de acrilamida sintetizados en el interior del capilar. También se emplean polímeros lineales solubles, como el polietilenglicol, dextrano o agarosa, polimerizados previamente e introducidos

en el capilar mediante presión; estos polímeros son muy útiles en la separación de proteínas.

En CGE se trabaja en ausencia de EOF o a valores muy bajos de éste, ya que en caso contrario el EOF produciría el avance del gel en el interior del capilar, perdiéndose el efecto de filtración molecular. Un inconveniente del CGE es que las moléculas sin carga no migran, o no lo hacen con suficiente velocidad. La selectividad puede ser alterada por la adición de selectores quirales y modificadores orgánicos.

II.9.4. Isoelectroenfoque capilar

El isoelectroenfoque capilar (CIEF, *capillary isoelectric focusing*) es una técnica de alta resolución empleada para separar péptidos y proteínas en base a diferencias de sus puntos isoeléctricos (pI). Esta técnica ya se empleaba en electroforesis en soporte plano, y ha sido adaptada la electroforesis capilar.

La separación tiene lugar mediante la generación de un gradiente de pH, que se consigue utilizando anfolitos para concentrar los solutos en estrechas bandas, mejorando así la resolución. Estos anfolitos son iones dobles y presentan un pI determinado, utilizándose mezclados en concentraciones iguales, y seleccionados cuidadosamente de forma que sus valores de log K abarquen un determinado intervalo de pH.

Al aplicar el campo eléctrico, los anfolitos y las proteínas migran hasta concentrarse en la región donde el pH es igual a su respectivo pI. A continuación se hacen pasar frente al detector aplicando presión y sin eliminar el campo eléctrico para no perder el enfoque.

La principal aplicación es la determinación del pI de proteínas, la separación de isoformes y de otras proteínas que presentan problemas por otros métodos, y la purificación de proteínas.

II.9.5. Isotacoforesis capilar

En isotacoforesis capilar (CITP, *capillary isotachophoresis*) se emplean dos sistemas tampón para conseguir un estado dinámico en el que las zonas separadas se muevan todas a la misma velocidad. Cada zona permanece en contacto con la siguiente, y todas ellas avanzan intercaladas entre los dos tampones denominados electrolito líder y terminal. De esta manera se consiguen separaciones rápidas, con la ventaja adicional de que los solutos se concentran hasta alcanzar como máximo las concentraciones de los electrolitos líder y terminal.

Para analizar aniones, por ejemplo, el electrolito líder ha de ser seleccionado de manera que contenga un anión con una movilidad electroforética efectiva mayor que la de los solutos. De forma semejante, el anión del electrolito terminal, ha de contener un anión que presente una movilidad aparente inferior a la de cualquier componente de la disolución a estudiar. Cuando se aplica el campo eléctrico, los aniones migran ordenados de mayor a menor movilidad, avanzando sin embargo a la misma velocidad, en zonas discretas y de concentraciones iguales, arrastrados por el electrolito líder.

II.9.6. Electrocromatografía capilar

La electrocromatografía capilar (CEC, *capillary electrochromatography*), utiliza capilares con un empaquetamiento cromatográfico de partículas. El perfil del flujo no es estrictamente plano, pero es más uniforme que los perfiles obtenidos mediante presión externa. A su vez, en CEC la uniformidad del empaquetado es menos importante que en un sistema de HPLC, porque la velocidad del EOF, en una primera aproximación, no depende del diámetro de los canales del empaquetado, mientras que la velocidad del flujo lineal en un sistema impulsado mediante presión externa es proporcional al cuadrado del diámetro de los canales.

La separación en CEC es el resultado de la combinación de efectos de la electroforesis y el reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria, pudiendo ser especialmente adecuada para la separación de solutos neutros.

No obstante, pese a las ventajas de la CEC su uso está menos difundido, siendo una de las causas el coste de los capilares con relleno.

II.10. Perspectivas futuras de la electroforesis capilar

Aunque el uso de la CE como técnica de análisis se ha popularizado desde hace tan sólo algo más de una década (los instrumentos comerciales surgieron en 1988), los avances en este área de la tecnología han permitido que sea totalmente competitiva y complementaria en relación a técnicas bien establecidas, como la cromatografía de gases (GC, *gas chromatography*) y la HPLC, convirtiéndose en una muy valiosa herramienta para resolver una gran variedad de problemas analíticos. La relativamente baja sensibilidad de la CE es actualmente su principal desventaja. De todas formas, los avances en el diseño de los capilares y de sus soportes, y en los sistemas ópticos complementarios, están aportando mejoras en este sentido.

II.11. Referencias

1. J.P. Landers, ed., Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC Press, Boca Raton, 1994.
2. S.F.Y. Li, Capillary Electrophoresis, principle, practice and applications, Elsevier, Amsterdam, 1992.
3. P. Camilleri, ed., Capillary Electrophoresis, theory and practice, CRC Press, Boca Raton, 1993.
4. D.N. Heiger, High performance Capillary electrophoresis, an introduction, Hewlett. Packard publ. No. 12-5091-699E, Waldbronn, Alemania, 1992.
5. P.R. Brown y E. Grushka, eds., Advances in Chromatography, Vol. 35, Capítulos 1-5, Marcel Dekker, Nueva York, 1995.
6. M.M. Rogan y K.D. Altria, Introduction to the theory and applications of capillary electrophoresis, Beckman publ. No. 726388, Fullerton, CA, 1993.
7. S. Hjerten, Chromatogr. Rev., 9 (1967) 122.
8. R. Virtenen, Acta Polytech. Scand., 123 (1974) 1.
9. F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts y T.P.E.M. Verheggen, 169 (1979) 11.
10. J.W. Jorgenson y K.D. Lukacs, Anal. Chem., 53 (1981) 1298.
11. J.W. Jorgenson, Trends Anal. Chem., 3 (1984) 51.
12. Z. El-Rassi y Y. Mechref, Electrophoresis, 17 (1996) 275.
13. M. Castagnola, I. Messana y D.V. Rosseti, Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology, ed. P.G. Righetti, CRC Press, Boca Raton, 1996, págs. 241-275.
14. M.S. Bello, L.Capelli y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 684 (1994) 311.
15. M.S. Bello, M.Y. Zhukov y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 693 (1995) 113.
16. S: Ermakov, M.Y. Zhukov, L.Capelli y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 699 (1995) 297.
17. P.G. Righetti, C. Gelfi, M. Perego, A.V. Stoyanov y A. Bossi, Electrophoresis, 18 (1997) 2145.
18. A.V. Stoyanov y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 790 (1997) 169.

19. S. Terabe, Micellar Electrokinetic Chromatography, Beckman publ. nº. 266924, Fullerton, CA, 1992.
20. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya y T. Ando, Anal. Chem., 56 (1984) 111.
21. S. Terabe, K. Otsuka y T. Ando, Anal. Chem., 61 (1989) 251.
22. K. Otsuka y S. Terabe, J. Microcol. Sep., 1 (1989) 150.
23. W.L. Hinze, Ordered Media in Chemical Separations, eds. W.L.hinze y D.L. Armstrong, American Chemical Society, Washington, DC, 1987.
24. P. Mukerjee y K.J. Mysels, Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactans Systems, Nat. Stand. Ref. Data Ser., 36 (1971) 227.
25. M. Yoshinaga y M. Tanaka, J. Chromatogr. A, 710 (1995) 331.
26. D.M. Small y M.G. Carey, J. Colloid Interface Sci., 312 (1969) 382-395.
27. D.M. Small, The Bile Acids, eds. P.P. Nair y D. Kritchevsky, Plenum Press, New York, 1971, págs. 249-356.
28. D.M. Small, Adv. Chem. Ser., 84 (1968) 31.
29. J.P. Kratohvil, Adv. Colloid Interface Sci., 26 (1986) 131.
30. H. Kawamura, Y. Murata, T. Yamaguchi, H. Igimi, M. Tanaka, G. Sugihara y J.P. Kratohvil, J. Phys. Chem., 93 (1989) 3321.
31. G. Conte, R. Di Blasi, E. Giglio, A. Parretta y N.V. Pavel, J. Phys. Chem., 88 (1984) 570.
32. G. Esposito, E. Giglio, N.V. Pavel y A. Zanobi, J. Phys. Chem., 91 (1987) 356.
33. A.R. Campanelli, C. De Sanctis, E. Chiessi, M. D'Alagni, E. Giglio y L. Scaramuzza, J. Phys. Chem., 93 (1989) 1536.
34. E.Giglio, S. Loreti y N.V. Pavel, J. Phys. Chem., 92(1988) 2858.
35. H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo y S. Terabe, J. Chromatogr., 498 (1990) 313.
36. R.O. Cole, M.J. Sepaniak y W.L. Hinze, J. High Resolut. Chromatogr., 13 (1990) 579.

37. R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, J. Gorse y K. Oldiges, J. Chromatogr., 557 (1991) 113.

38. H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo y S. Terabe, J. Chromatogr., 513 (1990) 279.

39. A.J. Ji, M.F. Nunez, D. Machacek, J.E. Fergunson, M.F. Iossi, P.C. Kao y J.P. Landers, J. Chromatogr. B, 669 (1995) 15.

40. S. Terabe, H. Nishi, T. Fukuyama y M. Matsuo, J. Microcol. Sep., 1 (1989) 234.

PARTE A

SISTEMAS REDOX ÁCIDO L-ASCÓRBICO/DEHIDROASCÓRBICO Y GLUTATIÓN/GLUTATIÓN DISULFURO COMO INDICADORES DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

III. SISTEMAS REDOX COMO INDICADORES DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

CAPÍTULO III

SISTEMAS REDOX COMO INDICADORES DE LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA

III.1. El estrés ambiental

Las plantas, a lo largo de su ciclo vital, se encuentran sometidas a una gran variedad de causas de estrés ambiental, lo que tiende a disminuir sus posibilidades de desarrollo y supervivencia (Tabla III.1). Cualquier condición ambiental desfavorable, o la presencia de sustancias que afecten o bloqueen el metabolismo de la planta son causas de estrés [1]. En este sentido, no se considera estrés a los reajustes rápidos de la actividad metabólica, como por ejemplo los debidos a cambios transitorios y no permanentes de intensidad luminosa, temperatura o humedad. El concepto de estrés es en sí mismo relativo, ya que una determinada situación ambiental puede resultar estresante para una especie y no para otras. Podemos diferenciar dos tipos de estrés, biótico y abiótico. El estrés abiótico está causado por la acción directa de seres vivos, mientras que el abiótico es el resultado de agentes físico-químicos.

Las plantas, poseen una variedad de mecanismos protectores, que atenúan e incluso previenen las alteraciones del equilibrio termodinámico o químico entre el ambiente externo y el interior celular. Gracias a los mecanismos protectores, las plantas tienen capacidad para tolerar o evitar el estrés. De este modo, la magnitud del daño inducido por un estrés determinado es un reflejo del éxito o del fracaso de los mecanismos de resistencia de la planta [2].

Tabla III.1. Condiciones o factores estresantes que pueden afectar al crecimiento y desarrollo de las plantas.

Estrés	Factores/Condiciones
Biótico	Animales grandes y pequeños, incluyendo insectos y nematodos
	Otras plantas
	Bacterias, hongos, virus y viroides patógenos
Abiótico	Sequía (estrés hídrico)
	Exceso de sales en el suelo (estrés salino)
	Calor, frío y congelación (estrés por temperaturas extremas)
	Encharcamiento e inundación (estrés por anaerobiosis)
	O_3, SO_2, herbicidas, etc. (estrés por contaminantes ambientales)
	Deficiencia en elementos minerales (estrés nutricional)
	Viento, suelo compacto, etc. (estrés mecánico)
	Lesiones o heridas

Al inicio del estrés tiene lugar una desestabilización de las funciones metabólicas de la planta, como resultado de la mayor demanda energética necesaria para minimizar las alteraciones metabólicas inducidas por la perturbación. A este estado, le sigue otro de normalización de las funciones, asociado con un aumento de la resistencia al estrés. No obstante, si los límites de tolerancia se sobrepasan, y se excede la capacidad adaptativa al estrés, puede producirse daño permanente e incluso la muerte del vegetal [3].

Es muy importante destacar que, en condiciones de campo, las situaciones de estrés múltiple son frecuentes. Ello implica que más de un factor ambiental puede limitar el desarrollo de la planta, de modo que la respuesta del vegetal no es predecible mediante un análisis por separado de los efectos de cada estrés. De este modo, de una combinación de diferentes factores de estrés puede resultar una sinergia o antagonismo [4].

Atendiendo a los estudios realizados y recogidos en esta Memoria, centraremos nuestro interés en el estrés provocado por los contaminantes atmosféricos, principalmente por ozono y dióxido de azufre.

III.2. Estrés por contaminantes ambientales

III.2.1. Contaminantes atmosféricos

Desde el inicio de la revolución industrial, la implantación de grandes industrias, así como el aumento del tráfico rodado, ha traído consigo importantes impactos ambientales, con repercusión tanto en zonas industriales como rurales. En la actualidad, el problema de la contaminación atmosférica es global.

Se entiende por contaminantes atmosféricos aquellas sustancias que producen efectos adversos y dañinos sobre las plantas, animales o materiales, modificando las propiedades físicas o químicas del ambiente, y produciendo un desequilibrio que los sistemas naturales de autodepuración son incapaces de superar.

Los contaminantes atmosféricos pueden clasificarse en virtud de su origen. Así, se consideran como *primarios* los que son directamente vertidos a la atmósfera desde los puntos de emisión (dióxido de azufre, óxidos de nitrógeno, metales pesados, etc.). Se denominan *secundarios* los que se sintetizan en la atmósfera durante el transporte, a partir de precursores químicos primarios, como sucede con la deposición ácida (derivados sulfonados o nitrogenados) o los fotooxidantes (ozono, nitrato de peroxiacetilo, etc.). En la Tabla III.2 se expone un listado de los contaminantes

atmosféricos que pueden afectar a los vegetales, indicando aquellos que tienen tendencia a acumularse.

La inmensa mayoría de los contaminantes dejan residuos en los vegetales, pudiendo detectarse mediante Análisis Químico, sin embargo, el ozono (por su corta permanencia) sólo puede detectarse por los síntomas específicos que produce en algunas especies, por ejemplo, el moteado clorótico en acículas de pino.

Tabla III.2. Contaminantes atmosféricos.

Tipo	Compuestos o factores en el aire	Derivados acumulables
Primarios	Óxidos de azufre	Compuestos azufrados
	Óxidos de nitrógeno, amoníaco	Compuestos nitrogenados
	Derivados fluorados	Compuestos fluorados
	Tóxicos: metales, comp. orgánicos	Metales pesados,
	Radioisótopos	Radionúclidos
	Clima: temperatura, precipitación, humedad relativa, radiación solar	
Secundarios	Sulfatos (deposición seca/húmeda)	
	Nitratos (deposición seca/húmeda)	
	Ozono (fotooxidantes)	Radicales libres
	Nitratos de peroxiacetilo (fotooxidantes)	
	Peróxido de hidrógeno	Peróxidos

III.2.2. Respuestas al estrés por contaminantes atmosféricos en plantas

a) Ozono

El ozono troposférico (O_3), es uno de los contaminantes atmosféricos secundarios más tóxicos para las plantas [5]. La formación del O_3 troposférico es debida tanto a fuentes naturales como de origen antropogénico. Las fuentes naturales son:

a) Formación durante las tormentas por las descargas eléctricas.

b) Intrusiones naturales de ozono desde la estratosfera.

La contribución natural de ozono al sistema troposférico es mucho menos importante que la debida a la actividad humana [6]. La emisión de hidrocarburos volátiles y óxidos de nitrógeno constituyen los compuestos claves a partir de los cuales se genera el ozono en la troposfera. La producción de ozono se debe, de modo simplificado, a reacciones que implican un equilibrio entre el NO_2 y el NO [7]:

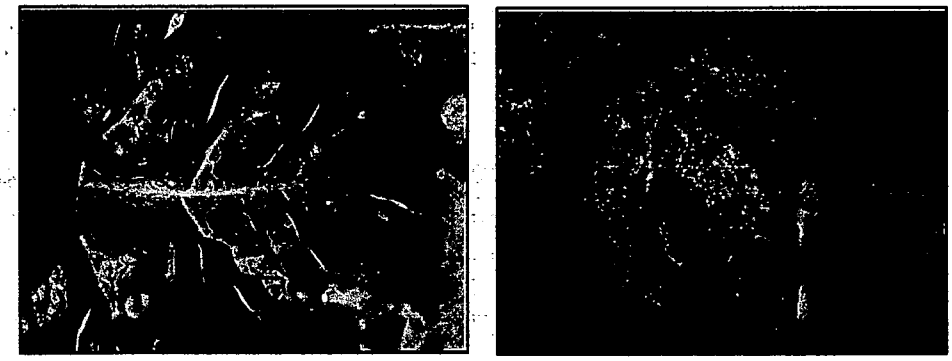
$$NO_2 + h\nu \longrightarrow NO + O$$
$$O + O_2 + M \longrightarrow O_3 + M$$

Estas reacciones permiten predecir de manera aproximada los cambios diarios en las concentraciones de O_3, aunque pueden desplazarse en uno u otro sentido por la presencia en la atmósfera de restos de hidrocarburos y radicales libres [8]. El ozono, o sus precursores, pueden ser transportados por los vientos dominantes desde su origen en las zonas industriales, hasta zonas rurales que pueden distar cientos de kilómetros de los focos de emisión.

El ozono es absorbido principalmente por los estomas, y una vez en el interior de la célula reacciona inmediatamente con los componentes celulares y su concentración disminuye. No obstante, los productos resultantes, principalmente radicales libres, son tan tóxicos como la propia molécula de ozono.

Los efectos del ozono sobre la vegetación pueden ser observados en el funcionamiento de las células, y en alteraciones de tejidos y órganos, o manifestarse en un deterioro general de toda planta, e incluso en un declive de las poblaciones, comunidades o ecosistemas (agrícolas, forestales, etc.).

Los episodios agudos de exposición a ozono, tales como concentraciones elevadas (superiores a 65 $\mu g/m^3$) durante pocas horas, pueden producir daños visibles en las hojas, tal como se observa en la Figura III.1. Estos síntomas se manifiestan en clorosis, moteado (manchas plateadas) y necrosis (células muertas que aparecen como manchas oscuras o pardas) [9]. Por otra parte, los efectos crónicos conducen a cambios en el crecimiento, productividad y calidad del material vegetal.



A **B**

Figura III.1. Efecto del ozono sobre hojas de sandía: A) muestra control; B) muestra expuesta a ozono.

Fisiológicamente, el estrés debido a O_3 se manifiesta en una reducción en la absorción del CO_2, asociado a una disminución de la conductividad estomática y de la capacidad de fijar CO_2 [10]. Además, las reacciones del ozono con los lípidos alteran la permeabilidad de la membrana, lo que dificulta la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) y dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), y disminuye la capacidad para el transporte de triosas fosfatadas (precursores de la síntesis de almidón y sacarosa).

El ozono también induce la senescencia foliar prematura [11], y una disminución del contenido de nitrógeno foliar, que es desviado desde las hojas viejas hasta las jóvenes, asociado a una pérdida del enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa-oxigenasa (RuBisCO) [2, 12]. También produce modificaciones en el cociente tallo/raíz, que tiende a aumentar tras las fumigaciones con ozono. Este último efecto es debido a una traslocación de elementos minerales, sobre todo carbono y nitrógeno, desde la raíz hasta las partes aéreas de la planta, donde son más necesarios [2].

b) Dióxido de azufre (SO_2)

El SO_2 se produce durante la combustión del carbón, gasolina, gas natural, madera, fundición de metales, etc. También se produce, aunque en menor cuantía, durante las erupciones volcánicas y en los incendios forestales [13]. Las emisiones de SO_2 de modo prolongado representan una seria amenaza para las masas forestales, pudiendo dar lugar a declive y muerte de los bosques [13].

El SO_2 se absorbe a través de los estomas y también puede producir daños en la superficie de las hojas, penetrando luego en el interior de la hoja. Una vez en el interior, el SO_2 reacciona con los fluidos celulares para formar sulfito, bisulfito y sulfato. Los equilibrios dependen del pH:

$$SO_2 + H_2O \longrightarrow H_2SO_3 \longrightarrow H^+ + HSO_3^- \longrightarrow H^+ + SO_3^{2-}$$

$$HSO_3^- + \tfrac{1}{2} O_2 \longrightarrow H^+ + SO_4^{2-}$$

El efecto de las fumigaciones con SO_2 se traduce, en primer lugar, en una acumulación en las partes aéreas [14, 15]. En las etapas iniciales de la destoxificación, el SO_2 se oxida a sulfato. Este proceso se produce en las paredes celulares, y está mediado por las peroxidasas. La incorporación del azufre tiene lugar fundamentalmente durante el metabolismo fotosintético, y genera como productos finales los aminoácidos cisteína y metionina. Esta incorporación del azufre a los aminoácidos altera el equilibrio carbohidratos/proteínas a favor de estas últimas [15]. No obstante, la eficacia de los procesos de destoxificación es limitada y una absorción prolongada de SO_2 incrementa la acidez de los compartimentos foliares [16].

La productividad agrícola se ve afectada por el SO_2 [15, 17], probablemente debido a la disminución de la fotosíntesis [17], al aumento de las tasas respiratorias y a la redistribución de los fotoasimilados. Estos procesos se encuentran directamente afectados, ya que el SO_2 y/o sus derivados interfieren con las vías metabólicas de adquisición de CO_2 [18]. Además, la productividad puede verse afectada de manera indirecta, ya que el SO_2 aumenta la sensibilidad frente a otras causas de estrés, lo que puede provocar la disminución de la fotosíntesis [19]. La sensibilidad de la fotosíntesis al SO_2 difiere marcadamente entre especies, probablemente debido a las diferentes tasas de absorción gaseosa, y a la diferente capacidad para metabolizar el contaminante una vez absorbido.

En coníferas, las alteraciones inducidas por el SO_2 en las ceras de las cámaras subestomáticas de las acículas pueden afectar al funcionamiento de los estomas [20]. El SO_2 también provoca cambios estructurales en las ceras superficiales de la epidermis, lo que facilita la pérdida de iones y la entrada de organismos patógenos [21]. Finalmente, la deposición seca y húmeda de SO_2 modifica la disponibilidad de nutrientes en el suelo, lo que provoca cambios en la concentración de elementos minerales en las hojas [16].

c) Óxidos de nitrógeno (NO_x)

Los NO_x presentes en el aire proceden de la incineración de basuras, de la actividad de la industria química y de la quema de combustibles fósiles. Se requieren concentraciones más altas de NO_x que de otros contaminantes, tales como O_3 y SO_2, para causar daños de similar magnitud en las plantas. Con frecuencia las concentraciones ambientales de NO_x son demasiado bajas para causar lesiones visibles, sin embargo, los NO_x participan en las reacciones que generan ozono troposférico.

Los daños agudos producidos por NO_2 en las plantas se parecen a los producidos de manera aguda por SO_2, penetrando en las hojas a través de los estomas y disolviéndose en el agua aplospática, donde producen nitritos y nitratos. Estos últimos se pueden metabolizar tras reducción previa.

III.3. Los vegetales como indicadores del estrés ambiental

III.3.1. Introducción a la indicación con vegetales

Los vegetales reaccionan frente a los contaminantes atmosféricos antes que cualquier otro ser vivo. Los vegetales son más sensibles en sus relaciones con el entorno, siendo su respuesta de un gran valor, dado que es la de un sistema biológico y, además, está diferenciada para cada especie o comunidad. La respuesta a la contaminación está en función de la combinación, concentración y duración de la acción de los contaminantes.

Además, los vegetales constituyen la base del funcionamiento y estructura de los ecosistemas, y por tanto, el diagnóstico de los efectos nocivos de la contaminación atmosférica sobre los vegetales permite establecer hipótesis predictivas sobre la evolución de la calidad del aire en amplios territorios. Es por ello, que sobre la base de la indicación con vegetales es posible desarrollar acciones o programas de defensa ambientales, antes de que los niveles de contaminación puedan afectar a la salud del hombre, o se produzca la desestabilización irreversible de los ecosistemas.

De esta forma, y con bajo coste, se pueden detectar aquellas masas de aire que transportan contaminantes, sin necesidad de establecer puntos de medición de parámetros físico-químicos y, al mismo tiempo, se pueden optimizar las redes de control de contaminación con sensores, al señalar las zonas donde éstos deben situarse, contribuyendo así al desarrollo de programas de sanidad ambiental.

Las principales reacciones consideradas en la indicación del estrés ambiental son:

(i) Cambios morfológicos y anatómicos: constituyen síntomas visibles de daños (efectos nocivos), o variaciones en la vitalidad o en la fructificación.

(ii) Alteraciones en la composición florística de las comunidades (desaparición de algunas especies y entrada de otras) y en la cobertura o frecuencia de algunas especies (estructura, dinamismo).

(iii) Variaciones en la respuesta funcional.

Las variaciones en la respuesta funcional pueden ser las siguientes:

- *Integridad de membranas*. El cambio en la permeabilidad de las membranas deja el camino libre a la pérdida de electrolitos y carbohidratos solubles. Estas pérdidas pueden ser fácilmente monitorizadas midiendo la conductividad del lixiviado y/o el contenido en potasio [22]. Se ha descrito la liberación del ion potasio como respuesta al tratamiento con metales pesados [23] y con SO_2 [24].

- *Degradación de pigmentos*. Frecuentemente se ha hecho uso de la degradación de clorofilas para evaluar los efectos de los contaminantes sobre la fotosíntesis [25]. Las medidas pueden ser espectrofotométricas o espectrofluorimetrías.

- *Alteración fotosintética.* Concentraciones muy bajas de SO_2 producen un estímulo de la fotosíntesis, pero concentraciones más altas siempre causan una reducción. La respuesta específica está influida por el tiempo de exposición, el pH y el estado de hidratación [26]. En contraste, la respiración en la oscuridad del material fumigado parece inalterada. Otros estudios comparativos han encontrado también que la respuesta fotosintética es más sensible y variable que la respiración [25]. A su vez, el estado energético de las células, establecido en base a la actividad de ATP, varía también en presencia de contaminantes del aire [27, 28].

- *Alteraciones en sistemas antioxidantes*. Las concentraciones de diversas especies químicas que intervienen en el metabolismo primario y/o secundario han demostrado estar fuertemente correlacionadas con la respuesta fisiológica de las plantas ante la agresión por parte de determinados contaminantes. Estas especies son:

- Metabolitos antioxidantes.

- Enzimas antioxidantes.

- Reguladores del sistema fotosintético, como los pigmentos del ciclo de las xantofilas (carotenos).

III.3.2. Metodologías del uso de vegetales como indicadores del estrés ambiental

La diagnosis de los efectos que los contaminantes provocan sobre bosques y cultivos requiere, en un primer paso, la identificación de las especies más sensibles a los contaminantes. Un segundo paso es la prospección del territorio, con la fijación de parcelas que permitan caracterizar y cuantificar los daños. Seguidamente, se deben poner los medios para tratar de correlacionar estos datos con los valores de inmisión de contaminantes, lo que implica disponer de sensores físico-químicos próximos a las áreas de muestreo.

Además, es necesario realizar experimentos de fumigación con gases contaminantes, en condiciones controladas, para establecer las relaciones causa-efecto. Las limitaciones en la interpretación de los datos provienen del hecho de que los resultados en laboratorio no son más que parcialmente extrapolables a lo que sucede en condiciones naturales, ya que las interrelaciones son muy complejas, y es prácticamente imposible controlar todas las variables. Para paliar estos problemas se introdujeron las cámaras abiertas (OTC, *open top chambers*) (Figura III.2),

normalizando así las metodologías de estudio de los efectos de la contaminación atmosférica sobre la vegetación.

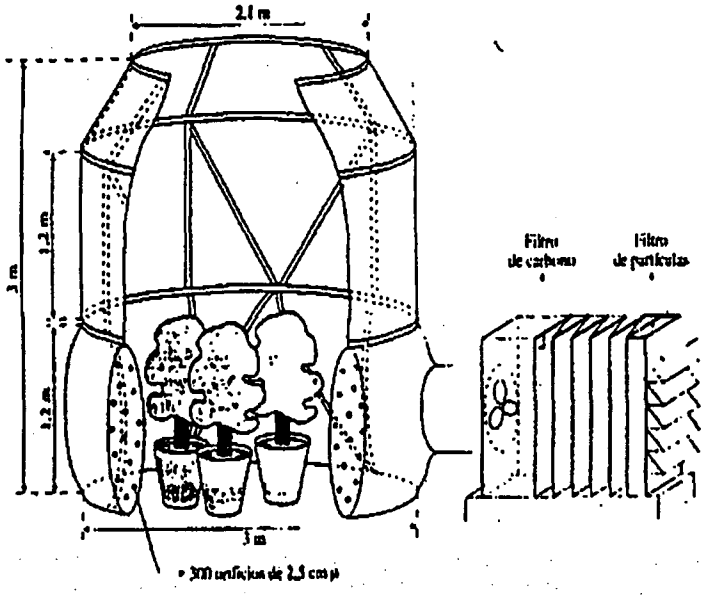


Figura III.2. Diagrama de una cámara abierta.

III.4. Sistemas antioxidantes

La formación de especies de oxígeno activo, tales como el oxígeno en estado singlete ($^1O_2$), el radical superóxido ($O_2^{-}\bullet$), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), es perjudicial para el funcionamiento de la célula. Aunque estas moléculas son productos del metabolismo celular aeróbico, su producción y destrucción es un proceso regulado [29]. El "estrés oxidativo" es la acumulación intracelular a niveles tóxicos de las especies de oxígeno activo, lo que implica la saturación de los sistemas antioxidantes de defensa, esto es se sobrepasa la capacidad de eliminación.

Los radicales libres poseen una reactividad alta (debido a su configuración paramagnética) e indiscriminada frente a diversas biomoléculas celulares a las que modifican oxidativamente. La oxidación implica la pérdida de su función biológica. Así por ejemplo, en contacto con los ácidos grasos poliinsaturados de los glicerolípidos de las membranas, los radicales libres forman peróxidos, y modifican los aminoácidos que componen las proteínas, induciendo la ruptura y la agregación de proteínas, haciéndolas más susceptibles al ataque de las proteasas. Además, causan mutaciones en los ácidos nucleicos. Para contrarrestar la toxicidad de las especies de oxígeno activo, las células vegetales disponen de un sistema antioxidante altamente eficaz, compuesto por constituyentes enzimáticos y no enzimáticos.

La exposición al ozono y a otros contaminantes altera la actividad de los sistemas antioxidantes tanto enzimáticos (ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa) como no enzimáticos (ascorbato, glutatión, α-tocoferol). Las especies vegetales que presentan mayor actividad antioxidante están mejor protegidas frente a los efectos adversos de los contaminantes atmosféricos. Esta característica les confiere cierta tolerancia, en comparación con las especies sensibles, que tienen menor actividad enzimática y menor concentración de sustancias antioxidantes.

III.4.1. Antioxidantes no enzimáticos

a) Ácido L-ascórbico

El ácido L-ascórbico (AA, *ascorbic acid*) está presente en los organismos fotosintéticos, incluidas las algas y los briófitos, en equilibrio con su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico, (DHA, *dehydroascorbic acid*) (Figura III.3). Las concentraciones de AA y DHA en plantas son muy variables, pero los tejidos que

muestran un crecimiento rápido, las hojas, y algunos frutos, son particularmente ricos en esta sustancia [30]. El cloroplasto también contiene elevadas concentraciones de AA, hasta 50 mM en espinaca, probablemente debido a su importante papel en la fotosíntesis [31]. Otros componentes celulares, como la vacuola y el citosol, también contienen AA [32]. Las células vegetales consumen AA mediante varios procesos:

(i) El AA tiene un papel central en los sistemas antioxidantes de los ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos del cloroplasto [31]: por un lado, reduce el anión superóxido y reacciona con los radicales hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, además de eliminar el oxígeno singlete [33, 34]; por otro lado, el AA regenera el α-tocoferol, un antioxidante liposoluble que protege a las membranas [35].

(ii) La hidroxilación de los residuos de prolina en las cadenas de polipéptidos.

(iii) La desepoxidación de las xantofilas debido a su papel de cofactor esencial de la enzima violaxantina-desepoxidasa [36].

(iv) El AA juega un papel importante en el control del transporte de electrones fotosintético y respiratorio [37] y en la división de las células vegetales [38].

El consumo activo de AA implica una oxidación que conduce, en primer lugar, a la formación de un radical libre denominado ácido monodehidroascórbico (MDHA). Éste se degrada rápidamente y forma el DHA. El DHA experimenta la ruptura hidrolítica del anillo, conduciendo en disolución acuosa al ácido 2,3-dicetogulónico (Figura III.3) [39]. La oxidación del AA y la hidrólisis del DHA están influenciadas por factores tales como temperatura, luz, pH, presencia de oxígeno disuelto, presencia de cationes metálicos, etc. [40-42].

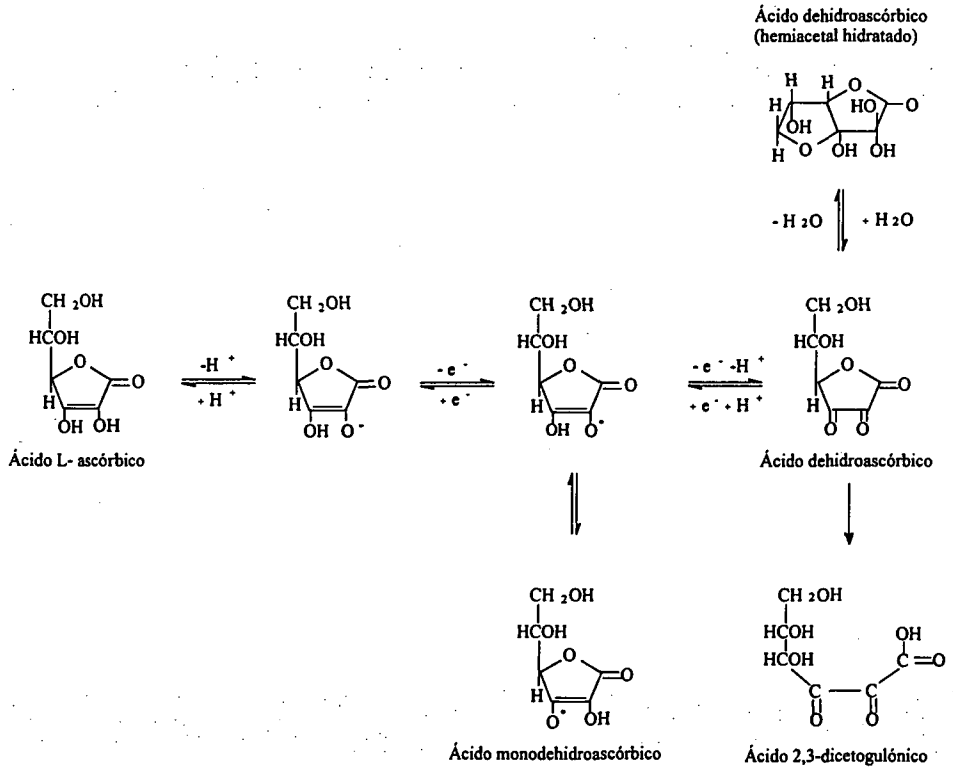


Figura III.3. El ácido L-ascórbico y sus productos de oxidación [39].

En las plantas, el AA constituye el sustrato reductor más importante en la destoxificación de H_2O_2. La eliminación de H_2O_2 tiene lugar a través de una serie de reacciones conocidas como el ciclo ascorbato-glutatión o ciclo de Halliwell-Asada (Figura III.4). Este ciclo tiene lugar en el estroma del cloroplasto, en la matriz mitocondrial y en el citosol. El ciclo implica la acción del NAPDH como reserva de electrones (Figura III.4). En la regeneración del AA participa el enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) que utiliza NADPH, y el enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) que utiliza glutatión reducido.

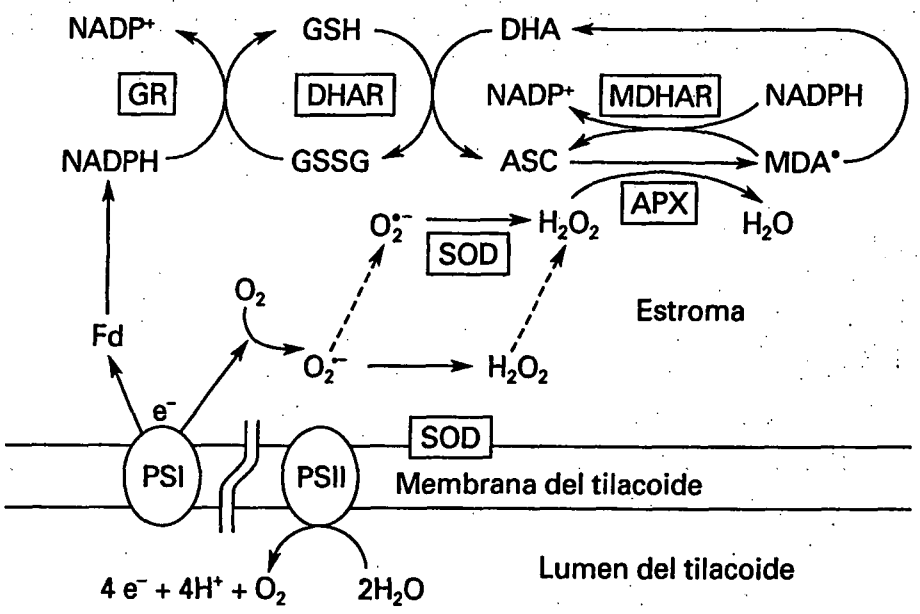


Figura III.4. Representación esquemática de los mecanismos y reacciones que participan en la eliminación del oxígeno activo y en la regeneración del ascorbato (ciclo de Halliwell-Asada o ciclo redox ascórbico-glutatión).

El AA tiene una función crucial en la protección de las plantas frente al estrés oxidativo, como indica el hecho de que la tolerancia al estrés provocado por O_3 y otras condiciones estresantes se correlaciona con los niveles endógenos de esta sustancia [33, 34, 43-45]. Por ello, la relación AA/DHA o AA/(AA+DHA) se utiliza como indicador del estrés ambiental, lo que a su vez convierte a este sistema redox en un indicador de la contaminación ambiental [33].

b) Glutatión

El glutatión es el tripéptido γ-glutamilcisteinilglicina (Figura III.5). Constituye el principal compuesto de almacenamiento y transporte de azufre orgánico en las plantas [35]. El glutatión puede encontrarse en forma reducida (GSH) o en forma oxidada como un dímero (GSSG), en el que los residuos de cisteína de dos moléculas de glutatión están unidas por un puente disulfuro. La forma reducida se regenera por reducción con NADPH, en una reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR).

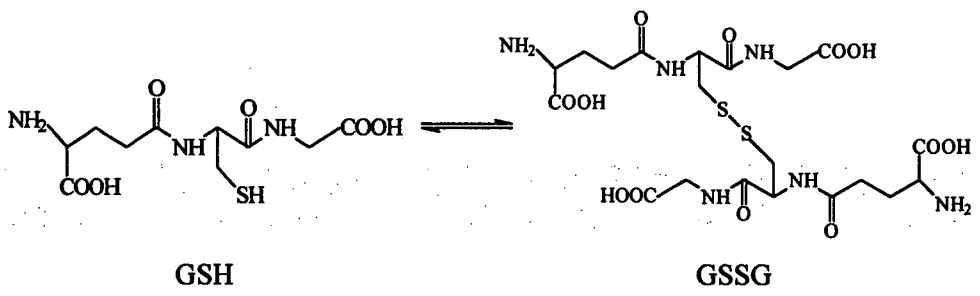


Figura III.5. Formas reducida (GSH) y oxidada (GSSG) del glutatión.

El glutatión desempeña en las plantas diversas funciones fisiológicas entre las que se destacan las siguientes [46, 47]:

(i) Almacenamiento y transporte de azufre reducido. El GSH se sintetiza en las hojas, especialmente en los cloroplastos, y una gran parte es exportado a la raíz y a las zonas de crecimiento del tallo, con objeto de suministrar azufre reducido [48]. En estos órganos importadores, el glutatión se descompone en sus tres componentes aminoacídicos, y la cisteína resultante se emplea para la síntesis de proteínas y metabolitos azufrados.

(ii) Reducción de puentes disulfuros en proteínas. El GSH, en función de su grupo tiol, protege de la oxidación los puentes disulfuro de los centros catalíticos de muchas enzimas, evitando su inactivación [49, 50].

(iii) Función protectora o de defensa: El GSH tiene la capacidad de formar conjugados con pesticidas (xenobióticos) y herbicidas (triazinas y cloroacetamidas) [51]. Además, es un precursor en la síntesis de fitoquelatinas, las cuales están implicadas en la destoxificación de metales pesados [52, 53].

(iv) Destoxificación del peróxido de hidrógeno en los cloroplastos (ciclo de Halliwell-Asada). Junto con el ascorbato, el GSH desempeña un importante papel en la destoxificación de especies activas oxigénicas que se forman en el cloroplasto en determinadas situaciones de estrés.

Debido a su grupo tiol, el GSH juega un papel importante en la defensa de las plantas y otros organismos frente al estrés oxidativo [50, 54]. El GSH sirve como sustrato para la regeneración del ascorbato, y según se ha propuesto, juega un importante papel en la estabilización de las membranas celulares, eliminando el peróxido de acilo formado durante la peroxidación de los lípidos por ataque oxidante [55]. Al igual que sucede en el caso del AA, la extrema sensibilidad del GSH frente a cambios bioquímicos lo convierte en un indicador ideal de estados patológicos o de estrés [56], empleándose el cociente GSH/GSSG o GSH/(GSH+GSSG) como indicador [33, 57].

Los estudios de correlación entre los niveles endógenos de GSH frente a condiciones de estrés [58-60], muestran un aumento en la cantidad relativa del GSSG, y por tanto una disminución en el cociente GSH/GSSG. Sin embargo, estudios de estrés asociados con inhibición o deficiencia de la catalasa [61], exposición a metales pesados [62], y exposición a ozono [44, 63, 64] muestran una acumulación de GSH.

c) α-Tocoferol

En células animales existe abundante bibliografía sobre el papel del α-tocoferol como antioxidante. En células vegetales, actúa en los espacios hidrófobos como protector de las membranas. Sus concentraciones en la célula son menores que las de AA y GSH, si bien, no por ello es menos importante su papel en los procesos de destoxificación de radicales libres [65].

III.4.2. Antioxidantes enzimáticos

Los enzimas implicados en la eliminación de las especies activas del oxígeno en vegetales son (Figura III.4, ciclo Halliwell-Asada):

(i) Superóxido dismutasa (SOD): cataliza la dismutación del radical superóxido, formando oxígeno y peróxido de hidrógeno. Varios estudios [66, 67] demuestran que la expresión de la SOD aumenta en condiciones ambientales que provocan un incremento de la formación de especies tóxicas de oxígeno.

(ii) Catalasa (CAT): descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Este enzima no se encuentra en el cloroplasto, localizándose en el citosol y los peroxisomas. Al igual que la SOD, la CAT responde a las condiciones ambientales [68, 69].

(iii) Ascorbato peroxidasa (APx): el daño oxidativo en el cloroplasto, en ausencia de catalasa, es paliado por la APx, que cataliza la oxidación del AA a MDHA, utilizando el H_2O_2.

(iv) Peroxidasa (POD): oxida el peróxido de hidrógeno a agua.

Otros tres enzimas que participan en el mantenimiento del AA y GSH en sus formas reducidas son la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR). La GR utiliza la NADPH como reductor, mientras que la MDHAR utiliza NADH y NADPH. Finalmente, la DHAR utiliza GSH como reductor. Los tres enzimas se localizan en el cloroplasto y el citosol. Todos ellos tienen una gran afinidad por sus sustratos, y su participación en el ciclo del AA-GSH es crucial, ya que permiten la continua regeneración del AA en el cloroplasto.

III.5. Determinación de ácido L-ascórbico en plantas

a) Preparación y conservación de muestras

Las condiciones de extracción son muy importantes en la determinación de AA. Como han indicado varios autores [39, 70], de estas condiciones dependerá la estabilidad del AA, siendo esencial inactivar las enzimas degradativas y fijar el equilibrio redox AA/DHA. La oxidación del AA y la hidrólisis de DHA dependen de muchos factores, tales como el pH, temperatura, presencia de oxígeno disuelto, enzimas e iones metálicos [40-42]. La mayoría de los extractantes empleados son disoluciones ácidas de elevada fuerza iónica, lo que es necesario tanto para inhibir la actividad metabólica de la célula y la precipitación de proteínas, como para prevenir la hidrólisis básica del anillo lactónico e inhibir la oxidación [40-42]. Los extractantes más utilizados son los ácidos metafosfórico (MPA, *metaphosphoric acid*) [41, 71, 72], tricloroacético [41, 42, 71], oxálico [40] y perclórico [73]. Sin embargo, el MPA en concentraciones entre el 2 y el 5% es el más ampliamente utilizado, ya que da lugar a recuperaciones mucho mayores que las obtenidas con ácido tricloracético al 10% [74, 75]. La extracción con ácido oxálico conduce a

recuperaciones del 85% , pero las muestras son menos estables que con MPA [76]. El ácido perclórico da lugar a rendimientos similares a los del MPA, pero es un agente menos eficaz en la precipitación de proteínas [77].

En las extracciones, se suelen emplear también D,L-homocisteína [78], 2-mercaptoetanol [79] y L-cisteína [80] como reductores. Muchas disoluciones extractantes se adicionan con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que forma complejos con cationes metálicos como Fe^{3+} o Cu^{2+}, inhibiendo así su acción catalítica sobre la oxidación del AA y sobre la hidrólisis del DHA [41, 42].

A su vez, se deben optimizar las condiciones que pueden acelerar la degradación del AA durante el resto del proceso de preparación y almacenamiento de la muestra. Así pues, la oxidación y reducción se retardan purgando con nitrógeno u otros gases inertes [41, 42, 72], congelando las muestras a -20°C [42, 81], y reduciendo al mínimo su exposición a la luz.

b) Técnicas analíticas

Se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de AA y DHA. Sin embargo, algunos procedimientos no son específicos, lo que complica las operaciones necesarias e incrementa el tiempo de análisis [82-83].

b.1) Volumetrías

Tillmans y col. [84] determinaron tanto AA como el contenido total de AA (previa reducción del DHA), mediante su valoración con 2,6-diclorofenol-indofenol (DCIP) [84, 85]. Este método es rápido y sencillo pero no tiene suficiente selectividad, ya que interfieren otras sustancias reductoras presentes en los extractos vegetales.

b.2) Técnicas espectrofotométricas

Con anterioridad a 1980, la mayoría de los métodos de determinación de AA estaban basados en procedimientos espectrofotométricos. Estos métodos incluyen la reducción del DCIP por el AA [71], la reducción de Fe(III) a Fe(II) por AA, seguida de la formación de un complejo absorbente de Fe(II) como ligando 2,2'-dipiridilo o bien o-fenantrolina [40, 41, 71, 86]. En éstos métodos, se debe reducir previamente el DHA a AA [86]. Roe y Kuether [87] propusieron el método de la 2,4-dinitrofenilhidrazina, basado en la oxidación del AA a DHA y ácido 2,3-dicetogulónico. El DHA se determina por condensación con el reactivo, dando lugar a la bis-2,4-dinitrofenilhidrazona. El AA total se determina mediante oxidación previa del AA a DHA, seguida de la formación de la hidrazona [88].

También, se ha propuesto un procedimiento de determinación fluorimétrica basado en la condensación de DHA con o-fenilendiamina [71]. En todos los casos, estos procedimientos carecen de sensibilidad y selectividad suficientes para su aplicación directa a la mayoría de las muestras reales [39].

El uso del enzima ascorbato oxidasa permite superar el problema de la falta de selectividad. La oxidación específica de AA a DHA se monitoriza mediante la disminución de la absorbancia del AA a 260-265 nm en presencia de exceso de enzima [89, 90]. Sin embargo, este procedimiento no puede ser usado para determinar de forma directa DHA.

b.3) Cromatografía líquida de alta resolución

Se han descrito numerosos métodos para la determinación de AA basados en la separación por HPLC con detección UV-vis [91-94], electroquímica [42, 76, 95, 96] o fluorimétrica [75]. La determinación por HPLC evita muchas

interferencias, y los análisis se caracterizan también por una alta sensibilidad. Existen numerosos protocolos robustos y precisos, pero por lo general los tiempos de análisis son largos, debido a la necesidad de reacondicionar periódicamente las columnas. Además, las muestras necesitan ser analizadas individualmente, puesto que el HPLC es una técnica secuencial.

Respecto a la determinación del DHA, debido a su baja absorbancia en el UV, se aplican procedimientos indirectos que implican su reducción con homocisteína [97, 98], ditiotreitol [81, 99] o L-cisteína [100], así como derivatización pre-columna [101] o post-columna [102].

b.4) Cromatografía de gases

La cromatografía de gases ha sido escasamente utilizada para determinar AA, posiblemente debido a las rigurosas condiciones necesarias para la derivatización. El AA se debe tratar con trimetilsilileter en ausencia de agua [40, 103]. Una ventaja de este enfoque es la posibilidad de determinar AA y DHA en el mismo cromatograma.

b.5) Electroforesis capilar

En los últimos años, la electroforesis capilar ha sido aplicada al análisis de AA [80, 104-110]. En comparación con las separaciones de HPLC, los análisis de CE son más rápidos y mucho más selectivos, siendo también destacable la capacidad para tratar nanomuestras. Se han desarrollado métodos de CE para la determinación de AA en vegetales y zumos de fruta empleando detección UV directa [80, 104, 105, 107-109] e indirecta [106] y electroquímica [110]. Para la

determinación de DHA, se ha recurrido a procedimientos indirectos que implican su reducción a AA [105]. Recientemente, Davey y col. [108] monitorizaron simultáneamente AA y DHA, si bien, no fue posible cuantificar este último por problemas de estabilidad de sus disoluciones.

III.6. Determinación de glutatión en plantas

a) Preparación y conservación de muestras

En la bibliografía se encuentran diferentes procedimientos para la extracción del glutatión en muestras biológicas [111]. Esta es una etapa crítica en el análisis del GSH, al igual que sucede con el AA. Se hace uso de extractantes tales como los ácidos 5-sulfosalicílico, pícrico, tricloroacético, trifluoroacético, perclórico y MPA [112-117]. Otra metodología recurre al empleo del ácido 5,5'-ditiobis(2-dinitrobenzoico) (DTNB) [118], omitiendo la desproteinización ácida; sin embargo, este procedimiento no inactiva las enzimas degradadativas del GSH. A su vez, suelen adicionarse diversos agentes protectores de los grupos tiol, como N-etilmaleimida (NEM) [119] El NEM debe ser eliminado antes del análisis, pero su extracción es engorrosa y suele conllevar pérdidas en la determinación de GSSG [120].

A su vez, también se deben adoptar condiciones que minimicen la degradación del GSH durante el resto de preparación y almacenamiento de la muestra. Al igual que se hace en la determinación del AA, la solución consiste en retrasar la oxidación purgando con nitrógeno u otros gases inertes [111], y también congelando las muestras a -70°C, especialmente en el caso de muestras de sangre y plasma [111].

b) Técnicas analíticas

b.1) Métodos enzimáticos

Las determinaciones enzimáticas de GSH y GSSG [116, 121, 122] se basan en el ciclo de la glutatión reductasa [116] que emplea DTNB como reactivo específico de los grupos tiol. Este ensayo es selectivo para la estimación de glutatión oxidado. Sin embargo, se puede determinar GSH por diferencia entre el GSSG y el glutatión total. Una desventaja del método enzimático es el elevado número de etapas necesarias para preparar extractos biológicos neutralizados en presencia o ausencia de NEM.

b.2) Cromatografía líquida de alta resolución

Se han propuesto numerosos métodos de HPLC para la cuantificación de GSH y GSSG en muestras biológicas, empleando diferentes sistemas de detección. El cociente GSSG/GSH se determina como índice del estrés oxidativo en plasma, hepatocitos, eritrocitos y otras matrices biológicas. Debido a las bajas concentraciones de los analitos en estas matrices, y a su pequeña absortividad molar, es necesario utilizar agentes derivatizantes. Con este fin, se ha utilizado DTNB [123], y S-carboximetilación de los tioles seguida por la derivatización cromogénica de los grupos amino con 2,4-dinitrofluorobenceno [124-126]. También se ha propuesto la derivatización fluorogénica con derivados de monobromobimano [127-130] o dansilados [131, 132]. Finalmente, también se ha utilizado detección electroquímica [133-136].

Sofic y col. [137] desarrollaron un procedimiento de HPLC con detección electroquímica para la determinación simultánea de AA y GSH en diferentes tejidos

animales y vegetales. Las formas oxidadas (DHA y GSSG) se determinaron de forma indirecta, previa reducción con ditiotreitol y glutatión reductasa, respectivamente.

b.3) Electroforesis capilar

La electroforesis capilar se ha utilizado para determinar GSH y otros tioles sin derivatización previa [108, 138-142]. Con el fin de aumentar la sensibilidad, también se han adaptado a la CE métodos que implican derivatización previa con monobromobimano [143, 144], DTNB, [145], NEM [146], 1,1'-etenilidenbis(sulfonil)bisbenceno [147] o 2,3-naftalendicarboxaldehído [148].

Recientemente, Davey col. [108], empleando un tampón borato de pH 9.0, han monitorizado simultáneamente AA y GSH en plantas; sin embargo, no realizaron estudios cuantitativos ni aplicaron el procedimiento a la evaluación del estrés oxidativo.

III.7. Referencias

1. H.K. Lichtenthaler, J. Plant Physiol., 148 (1996) 4.
2. E.J. Pell, P.J. Temple, A.L. Friend, H.A. Mooney y W.E. Winner, J. Environ. Qual., 23 (1994) 429.
3. W. Larcher, Physiological Plant Ecology, Springer-Verlag, Berlin, 1995.
4. C.B. Osmond, M.P. Austin, J.A. Billings, J.S. Boyer y W.J.H. Dacey, Bioscience, 37 (1986) 38.
5. EPA, Air Quality Critetia for Ozone and other Photochemical Oxidants, Vol I, EPA 600/8-841020 CF, U.S. Environ. Protection Agency, Carolina del Norte, 1996.
6. I. Colbeck y A.R. Mackenzie, Air pollution by photochemical oxidants. Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1994.
7. J.H. Seinfield, Science, 243 (1989) 745.
8. R. Atkinson, Atmos. Environ., 24 (1990) 1.
9. S.V. Krupa y W.J. Manning, Environ. Pollut., 50 (1988) 101.
10. S. Ciompi, A. Castagna, A. Ranieri, C. Nali, G. Lorenzini y G.F. Soldatini, Physiol. Plantarum, 101 (1997) 881.
11. T.K. Stow, H.L. Allen y L.W. Kress, Forest Sci., 38 (1992) 102.
12. E.J. Pell, N. Eckardt y A.J. Enyedi, New Phytol., 120 (1992) 397.
13. B. Freedman, Environmental Ecology, the Impacts of Pollution and Other Sresses on Ecosystems Structure and Function, Academic Press, Nueva York, 1989.

14. T.A.W. Van-der-Kooij, L.J. De-Kok, S. Haneklaus y E. Schnug, New Phytol., 135 (1997) 101.

15. P.J.A. Shaw y A.R. McLeod, Plant Cell and Environ., 18 (1995) 237.

16. W. Kaiser, A. Dittrich y U. Heber, Tree Physiol., 12 (1993) 1.

17. G. Lorenzini, A. Panicucci y C. Nali, Water, Air and Soil Pollut., 85 (1995) 1257.

18. S. Hippeli y E,F. Elster, J. Plant Physiol., 148 (1996) 249.

19. M. Strand, Physiol. Plantarum, 95 (1995) 581.

20. C.R. Black y M.H. Unsworth, J. Exp. Bot., 31 (1980) 667.

21. S. Warrington y J.B. Whittaker, Environ. Pollut., 65 (1990) 363.

22. M. Arhoun, "Caracterización de la contaminación atmosférica mediante determinación de algunos iones inorgánicos en bioindicadores vegetales", Tesis Doctoral, Facultad de Química, Universidad de Valencia, 1998.

23. Servicio de protección contra agentes nocivos. Inventario CEE-ECE de daños forestales, Ecologia, 2 (1988) 411.

24. L. Sigal y T.H. Nash III, Ecology, 64 (1983) 1343.

25. J.M. Skelly y J.L. Innes, Plant Disease, 78 (1994) 569.

26. W.H. Smith, Environ. Pollut., 6 (1974) 111.

27. E.W. Winner y H.A. Mooney, Oecologia, 44 (1980) 290.

28. E.W. Winner, H.A. Mooney y R.A. Goldstein, Sulfur dioxide and vegetation, Standford University Press, Standford, 1985.

29. K. Asada, Physiol. Plantarum, 82 (1992) 235.

30. G.M. Jaffe, Handbook of Vitamins, ed. J.L. Machlin, Marcel Dekker, NuevaYork, 1984.

31. C.H. Foyer, M. Lelandais y K.J. Kunert, Physiol. Plantarum, 92 (1994) 696.

32. A.A.F. Rautenkranz, L.L.F. Mächler, E. Martinoiä y J. Oertli, Plant Physiol., 106 (1994) 187.

33. U. Heber, C. Miyake, J. Mano, C. Ohno y K. Asada, Plant Cell Physiol., 34 (1996) 1066.

34. P.L Conklin, E.H. Williams y R.L. Least, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98 (1996) 55.

35. K.J. Kunert y C.H. Foyer, Thiol/disulphide exchange in plants, en Sulfur nutrition and assimilation in higher plants, ed. L.J. de Kok, SPB Academic Publishing, La Haya, 1993.

36. C. Neubauer y H.Y. Yamamoto, Photosynth Res., 39 (1994) 137.

37. G. Forti y A.M Ehrenheim, Biochim. Biophys. Acta, 1183 (1993) 408.

38. P. Navas, J.M. Villalba y F. Córdoba, Biochim. Biophys. Acta, 1197 (1994) 1.

39. P.W. Washko, R.W. Welch, K. R. Dhariwal, Y. Wang y M. Levine, Anal. Biochem., 204 (1992) 1.

40. J.R. Cooke y R.E.D. Moxon, Vitamin C, eds. J. N. Counsell y D. H. Horning, Applied Science Publishers, Londres, 1981, págs. 167-189.

41. H.E. Sauberlich, M.D. Green y S.T. Omaye, Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses, eds. P.A. Seib, y B.M. Tolbert, American Chemical Society, Washington, 1982, págs. 199-221.

42. P.W. Washko, W.O. Hartzell y M. Levine, Anal. Biochem., 181 (1989) 276.

43. F.J. Castillo y H. Greppin, Environ. Exp. Res., 281 (1988) 231.

44. A.S. Gupta, R.G. Alscher y D. McCune, Plant Physiol., 96 (1991) 650.

45. F. Mächler, M.R. Wasescha, F. Krieg y J.J. Obertli, J. Plant Physiol., 148 (1996) 469.

46. H. Rennenberg, Phytochemistry, 21 (1982) 2771.

47. C.H. Foyer, H. López-Delgado, J.F. Dat y I. Scott, Physiol. Plantarum, 100 (1997) 241.

48. A.G. Lappartient y B. Touraine, Plant Physiol., 111 (1996) 147.

49. B. Halliwell y C. H. Foyer, Planta, 139 (1978) 9.

50. R.G. Alscher, Physiol. Plantarum, 77 (1989) 457.

51. K. Marrs, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 47 (1996) 127.

52. H.V. Scheller, B. Huang, E. Hatch, P.B Goldsbrough, Plant Physiol., 85 (1987) 1031.

53. E. Grill, S. Loffler, E.L. Winnacker y M.M Zenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 (1989) 6838.

54. C.M. Grant, F.H. McIver y I.W. Dawes, Curr. Genet., 29 (1996) 511.

55. A. Prince, P.W. Lucas y P.J. Lea, J. Exp. Bot., 41 (1990) 1309.

56. A. Meister y M.E. Anderson, Annu. Rev. Biochem., 52 (1983) 711.

57. B. Halliwell y J.M.C. Gutteridge, Biochem. J., 219 (1984) 1.

58. C.L. Guy, J.V. Carter, G. Yelenski y C.T. Guy, Criobiology, 21 (1984) 443.

59. R.S. Dhindsa, Plant Physiol., 95 (1991) 648.

60. I. Kranner y D. Grill, Phyton, 32 (1992) 69.

61. I.K. Smith, A.C. Kendall, A.J. Keys, J.C. Turner y P.J. Lea, Plant Sci., 41 (1985) 11.

62. S. Schnedier y L. Bergmann, Bot. Acta, 108 (1995) 34.

63. A. Ranieri, L. Lencioni, G. Schenone y G.F. Soldatini, J. Plant Physiol., 142 (1993) 286.

64. M. Luwe, Plant, Cell and Environ., 19 (1996) 321.

65. L.R.C. Barclay, J. Biol. Chem., 263 (1988) 16138.

66. C. Bowler, M. Van Montagu y D. Inze, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 431 (1992) 83.

67. J.G. Scandalios, Plant Physiol., 101 (1993) 205.

68. B. Hertwing, P. Streb y J. Feierabend, Plant Physiol., 100 (1992) 1547.

69. P. Streb, J. Feierabend y R. Bligny, Plant, Cell and Environ., 20 (1997) 1030.

70. K. Kampfenkel, M. Van Montagu y D. Inze, Anal. Biochem., 225 (1995) 165.

71. S. T. Omaye, J.D. Turnbull y H. E. Sauberlich, Methods in Enzymology, Vol. 32, eds. D.B. McCornick y L. D. Wright, Academic Press, Nueva York, 1979, págs. 62-311.

72. S. A. Margolis y I. Black, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 90 (1987) 806.

73. T. R. Ruiz, C. M. Lozano y A. Sanz, Anal. Chim. Acta, 308 (1995) 299.

74. K. Tanishima y M. Kita, J. Chromatogr., 613 (1993) 275.

75. M. R. Brown y K. A. Miller, J. Appl. Phycol., 4 (1992) 205.

76. W.A. Behrens y R. Madere, Anal. Biochem., 165 (1987) 102.

77. J. H. Roe, Methods of Biochemical Analysis, Vol.1, ed. D. Glick, Academic Press, Nueva York, 1956, págs. 115-140.

78. L.L. Lloyd, F. Warner, J. F. Kennedy y C.A. White, Food Chem., 28 (1988) 257.

79. A. Jain, A. Chaurasia y K.K. Verma, Talanta, 42 (1995) 779.

80. J. Schiewe, Y. Mrestani y R. K. Ito, J. Chromatogr. A, 717 (1995) 255.

81. S.A. Margolis y T. P. Davis, Clin. Chem., 34 (1988) 2217.

82. M.R.H. Lowik, J. Schrijver y M. Wedel, Int. J. Vit. Nutr., 61 (1991) 43.

83. J.M. Kim, K. Huang y R.D. Schmid, Anal. Lett., 23 (1990) 2273.

84. J. Tillmans, P Hirsch y F. Siebert, Z. Unters. Lebensm., 63 (1932) 21.

85. K. Hiromi, C. Kuwomoto y M. Ohnishi, Anal. Biochem., 101 (1980) 421.

86. M. Okamura, Clin. Chim. Acta, 115 (1981) 393.

87. J.H. Roe y C.A. Kuether, J. Biol. Chem., 147 (1943) 399.

88. O. Pelleltier y R. Brossard, J. Food Sci., 42 (1977) 1471.

89. T.Z. Liu, N. Chin, M.D. Kiser y W.N. Bigler, Clin. Chem., 28 (1992) 2225.

90. R. Stevanato, L. Avigliano, A. Finazzi-Agro y A. Rigo, Anal. Biochem., 149 (1985) 537.

91. D.B. Dennison, T. G. Brawley y G.L.K. Hunter, J. Agric. Food Chem., 29 (1981) 927.

92. L.F. Liebes, S. Kuo, R. Krigel, E. Pelle y R. Silber, Anal. Biochem., 118 (1981) 53.

93. C.W. Wilson y P.E. Shaw, J. Agric. Food Chem., 35 (1987) 329.

94. G. Barja de Quiroga, M. Lopez-Torres, R. Perez-Campo y C. Rojas, Anal. Biochem., 199 (1991) 81.

95. M. Grun y F.A. Loewus, Anal. Biochem., 229 (1995) 329.

96. L.S. Liau, B.L. Lee, A.L. New y C.N. Ong, J. Chromatogr. A, 612 (1993) 63.

97. L.L. Lloyd, F.P. Warner, C.A. White y J.F. Kennedy, Chromatographia, 24 (1987) 371.

98. R.C. Rose y D.L. Nahrwold, Anal. Biochem., 114 (1981) 140.

99. L.W. Doner y K.B. Hicks, Anal. Biochem., 115 (1981) 225.

100. H. Iwase y I.Ono, J. Chromatogr. A, 654 (1993) 215.

101. S. Garcia-Castineiras, V.D. Bonnet, R. Figueroa y M. Miranda, J. Liq. Chromatogr., 4 (1981) 1619.

102. J.T. Vanderslice y D.J. Higgs, J. Micronutr. Anal., 7 (1990) 67.

103. J.E. Schlack, J. Assoc. Off. Agric. Chem., 57 (1974) 1346.

104. E.V. Koh, M.G. Bissell y R.K. Ito, J. Chromatogr., 633 (1993) 245.

105. M. Chiari, N. Nesi, G. Carrea y P.G. Righetti, J. Chromatogr., 645 (1993) 197.

106. C.H. Wu, Y.S. Lo, Y.H. Lee y T.I. Lin, J. Chromatogr. A, 716 (1995) 291.

107. M. W. Davey, G. Bauw y M. Van Montagu, Anal. Biochem., 239 (1996) 8.

108. M.W. Davey, G. Bauw y M. Van Montagu, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 269.

109. A. Prochazkova, L. Krivankova y P. Bocek, Electrophoresis, 19 (1998) 300.

110. J. Olsson, O. Nordstrom, A.C. Nordstrom y B. Karlberg, J. Chromatogr. A, 826 (1998) 227.

111. J. Roberts y D.J. Francetic, Anal. Biochem., 211 (1993) 183.

112. O.W. Griffith y A. Meister, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 (1979) 5606.

113. B.J. Mills, J.P. Richie, Jr., y C.A. Lang, Anal. Biochem., 184 (1990) 263.

114. P.R.C. Harvey, R.G. Ilson y S.M. Strasberg, Clin. Chim. Acta, 180 (1989) 203.

115. B.A. Neuschwande y F.J. Roll, Anal. Biochem., 179 (1989) 236.

116. F. Tietze, Anal. Biochem., 27 (1969) 502.

117. P.C. Jocelyn, en Methods in Enzymology, eds. W.B. Jakoby y O.W. Grifftih, Academic Press, Orlando, 1987, págs. 44-67.

118. J.D. Adams, Jr., B.H. Lauterburg y J.R. Mitchell, J. Pharmacol. Exp. Ther., 227 (1983) 749.

119. M.E. Anderson, en Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Part A, eds. D. Dolphin, O. Avramovic y J. Viña, Wiley, Nueva York, 1985, págs, 303-365.

120. P. Sacchetta, D. Di Cola y G. Federici, Anal. Biochem., 154 (1986) 205.

121. O.W. Griffith, Anal. Biochem., 106 (1980) 207.

122. M.E. Anderson, Methods Enzymol., 113 (1985) 548.

123. J. Reeve, J. Kuhlenkamp y N. Kaplowitz, J. Chromatogr., 194 (1980) 424.

124. D.J. Reed, J.R. Babson, P.W. Beatty, A.E. Brodie, W.W. Ellis y D.W. Potter, Anal. Biochem., 106 (1980) 55.

125. M.W. Fariss y D.J. Reed, Methods Enzymol., 143 (1987) 101.

126. J.H. Siller-Cepeda, T.H.H. Chen y L.H. Fuchigami, Plant Cell Physiol., 32 (1991) 1179.

127. G.L. Newton, R. Dorian y R.C. Fahey, Anal. Biochem., 114 (1981) 383.

128. S.S. Fenton y R.C. Fahey, Anal. Biochem., 154 (1986) 34.

129. A. Svardel, M.A. Mansoor y P. Ueland, Anal. Biochem., 184 (1990) 338.

130. G.L. Newton y R.C Fahey, Methods Enzymol., 251 (1995) 148.

131. J. Martin y I.N.H. White, J. Chromatogr., 568 (1991) 219.

132. K. Mopper y D. Delmas, Anal. Chem., 56 (1984) 2557.

133. A.F. Stein, R.L. Dills y C.D. Klaassen, J. Chromatogr., 381 (1986) 259.

134. A. Rodriguez-Ariza, F. Toribio y J. Lopez-Barea, J. Chromatogr. B, 656 (1994) 311.

135. W.A. Kleinman y J.P. Richie Jr., J. Chromatogr. B, 672 (1995) 73.

136. N.C. Smith, M. Dunnett y P.C. Mills, J. Chromatogr. B, 673 (1995) 35.

137. E. Sofic, P. Riederer, R. Burger, W. Gsell y G. Heuschneider, Fresenius J. Anal. Chem., 339 (1991) 258.

138. N. Ercal, K. Le, P. Treeratphan y R. Mathews, Biomed. Chromatogr., 10 (1996) 15.

139. B. Mechalke, J. Chromatogr. A, 716 (1996) 323.

140. C. Muscari, M. Pappagallo, D. Ferrari, E. Giordano, C. Capanni, C.M. Caldarera y C. Guarnieri, J. Chromatogr. B, 707 (1998) 301.

141. M. Cappiello, A. Del Corso, M. Camici y U. Mura, J. Biochem. Biophys. Methods, 26 (1993) 335.

142. K.C. Panak, O.A. Ruiz, S.A. Giorgieri y L.E. Diaz, Electrophoresis, 17 (1996) 1613.

143. K.S. Wong y E.S. Yeung, Mikrochim. Acta, 120 (1995) 321.

144. B.L. Hogan y E.S. Yeung, Anal. Chem., 64 (1992) 2841.

145. J. Russell y D.L. Rabenstein, Anal. Biochem., 242 (1996) 136.

146. G. Piccoli, M. Fiorani, B. Biagiarelli, F. Palma, L. Potenza, A. Amicucci y V. Stocchi, J. Chromatogr. A, 676 (1994) 239.

147. V. Cavrini, R. Gotti, V. Andisano y R. Gatti, Chromatographia, 42 (1996) 515.

148. O. Orwar, H.A. Fishman, N.E. Ziv, R.H. Scheller y R.N. Zare, Anal. Chem., 67 (1995) 4261.

IV. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO Y DE ASCÓRBICO TOTAL EN PLANTAS VASCULARES Y NO VASCULARES POR ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO Y DE ASCÓRBICO TOTAL EN PLANTAS VASCULARES Y NO VASCULARES POR ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

Capítulo publicado en Analytical Biochemistry (Anexo II).

Resumen

Se describe un procedimiento de electroforesis capilar zonal (CZE) para la determinación de ácido L-ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT, suma de AA y ácido dehidroascórbico) en plantas vasculares y en líquenes, briófitos y hepáticas. Las muestras se congelan en nitrógeno líquido y se extraen con ácido metafosfórico al 2%. Para determinar AA, se inyecta directamente una alícuota en el capilar de sílice fundida. La determinación de AAT se realiza después de su reducción con DL-homocisteína a pH 7. El electrolito de fondo contiene 60 mM de cloruro sódico, 60 mM de dihidrógeno fosfato sódico, 0.0001% de bromuro de hexadimetrina, y NaOH hasta alcanzar pH 7. El procedimiento es rápido y muy reproducible; el límite de detección es 0.2 $\mu g\ ml^{-1}$, que corresponde a 0.4 mg/100 g de muestra. El método propuesto se valida por comparación con un método enzimático habitual. El procedimiento de CZE se puede aplicar correctamente y ofrece resultados para todas las muestras ensayadas, mientras que el método enzimático no se puede utilizar para cuantificar AA en algunas plantas que dan una alta absorción de fondo en la región UV.

Palabras clave: ácido ascórbico; indicadores de contaminación atmosférica; líquenes; briófitos; hepáticas; electroforesis capilar zonal.

IV.1. Introducción

El ácido L-ascórbico (AA), en equilibrio con su forma oxidada, ácido L-dehidroascórbico (DHA), se encuentra universalmente distribuido, tanto en animales como en vegetales. La determinación de AA y de ácido ascórbico total (AAT = AA + DHA) es de gran importancia, puesto que el cociente AA/AAT es un indicador de la calidad ambiental [1]. Los factores que provocan estrés en los vegetales, incluyendo tanto daños mecánicos como contaminación atmosférica, alteran este cociente.

Las concentraciones de AA y DHA varían ampliamente en los vegetales, encontrándose generalmente los niveles más altos en tejidos y hojas en crecimiento [2]. Más del 3 % del peso fresco de ciertas frutas es AA [3]. Las células vegetales consumen activamente AA en varios procesos: (i) la eliminación de peróxido de hidrógeno y radicales libres oxigenados producidos por contaminantes atmosféricos [1, 4]; (ii) la hidroxilación de residuos de prolina en cadenas polipeptídicas [5]; y (iii) la de-epoxidación de carotenoides en el ciclo de las xantofilas [6]. Adicionalmente, el AA juega un papel destacado en el control del transporte electrónico fotosintético y mitocondrial [7], y en el control de la división celular en plantas [8]. Las concentraciones de AA en cloroplastos son altas, alcanzando valores del orden de 50 mM en espinaca, lo cual esta probablemente relacionado con su papel central en la fotosíntesis [9]. También, el AA se halla presente en otros orgánulos celulares como el citosol, las vacuolas y la membrana celular [10, 11].

En el cuerpo humano, el AA juega un papel fisiológico importante en la absorción de hierro, en el metabolismo de esteroides y aminoácidos aromáticos, en la síntesis de polisacáridos y colágenos y en el desarrollo neonatal. Una insuficiente ingestión de AA conduce a una deficiencia de colágeno, lo que provoca los síntomas de la enfermedad conocida como escorbuto. También se ha demostrado la capacidad del AA para desempeñar un papel inhibidor en ciertas formas de crecimiento de células cancerígenas *in vitro* [12-14].

La estabilidad de las disoluciones acuosas de AA depende del pH, de la temperatura, la concentración de oxígeno, y de la presencia de trazas de iones metálicos que catalizan su oxidación [15-18]. Para determinar AA y AAT en zumos de fruta y otros productos industriales, se han empleado métodos espectrofotométricos [19-28], polarografía diferencial de impulsos [29] y potenciometría de adsorción [30]. Sin embargo, estos métodos carecen de la adecuada selectividad para analizar extractos de plantas vasculares y no vasculares [19, 20]. Se han descrito procedimientos específicos basados en la oxidación de AA en presencia de ascorbato-oxidasa [31-33], y en el uso de técnicas de separación, incluyendo cromatografía de gases con derivatización pre-columna [34], HPLC en fase inversa [35-39], de exclusión iónica [40-44], de pares iónicos [45], y de intercambio iónico [46], así como isotacoforesis [47, 48] y otras técnicas de electroseparación capilar [49-63].

Se han desarrollado procedimientos de electroforesis capilar zonal (CZE) para la determinación de AA en vegetales y zumos de fruta [52-54, 56-59, 61]. Se han utilizado capilares recubiertos con poliacrilamida [52, 54] y con bromuro de tetradecil trimetilamonio [61]. También se ha empleado cromatografía micelar electrocinética (MEKC) con un electrolito soporte (BGE) conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS) [49], o bien desoxicolato sódico (SDC, *sodium deoxycholate*) [50, 51], para determinar AA en preparados vitamínicos y en vegetales, respectivamente.

En este capítulo, se determina AA mediante CZE en presencia de bromuro de hexadimetrina (HDM, *hexadimetrine bromide*). El HDM es una sal de amonio cuaternario polimérica capaz de invertir eficazmente el flujo electroosmótico (EOF) incluso a concentraciones muy bajas. La determinación de DHA se realiza como AA, tras reducción previa con homocisteína. El procedimiento es rápido y altamente reproducible, y los límites de detección son inferiores a los encontrados en otros métodos de electroseparación capilar. El método se ha aplicado a plantas vasculares, y también a líquenes, briófitos y hepáticas, que contienen concentraciones de AA y DHA menores que las plantas vasculares. El método se valida mediante la comparación con un método enzimático [31]. Finalmente, se discuten los resultados

hallados en relación con el cociente AA/AAT, que como se ha comentado es un valioso indicador de la contaminación atmosférica.

IV.2. Parte experimental

IV.2.1. Reactivos

Se prepararon disoluciones de 250 μg ml^{-1} de AA (Sigma, St Louis, MO, USA) en ácido metafosfórico (MPA) al 2 % (w/v) (Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Para prevenir la oxidación, las disoluciones se prepararon en frío y se almacenaron a 4°C. Inmediatamente antes de la inyección, se prepararon también disoluciones de 10 μg ml^{-1} de DHA (Aldrich) en MPA al 2 %. Se utilizaron hidróxidos sódico y potásico, dihidrógenofosfatos sódico y potásico, ácido bórico y cloruro sódico (Panreac, Barcelona), todos ellos de calidad para análisis. En el método enzimático se empleó ascorbato-oxidasa (prod. núm. A0157, Sigma). La reducción del DHA se realizó con DL-homocisteína (Sigma). El recubrimiento dinámico del capilar y el cambio del sentido del EOF se consiguió gracias al empleo de bromuro de hexadimetrina (HDM, Fluka, Buchs, Suiza) conteniendo de 25 a 50 unidades de hexadimetonio. En los experimentos realizados con capilares recubiertos de acrilamida se emplearon los siguientes reactivos: acrilamida, persulfato amónico, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato (agente silano enlazante) (Fluka). En la preparación de todas las disoluciones se utilizó agua nanopura (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA). Antes de su introducción en el sistema electroforético, las disoluciones se desgasificaron en un baño de ultrasonidos (Modelo 617, Selecta, Barcelona), y seguidamente se pasaron a través de un filtro de nylon de 0.45 μm de tamaño de poro (Scharlau, Barcelona).

IV.2.2. Aparatos

Se utilizó un sistema de electroforesis capilar HP ^{3D} (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), equipado con un detector espectrofotométrico de fila de diodos, conectado a un ordenador VECTRA HP 486/66XM. El capilar de sílice fundida empleado fue de 33.5 cm de longitud y 50 µm de diámetro interno (Supelco, Bellefonte, USA). La ventana de detección se practicó a 8.5 cm del extremo de salida. El acondicionamiento del capilar nuevo se realizó haciendo pasar por su interior disoluciones de NaOH 1 y 0.1 M durante 5 min, y posteriormente agua nanopura durante 10 min, todo ello a una temperatura constante de 60 °C. Al comienzo de cada sesión de trabajo, el capilar se acondicionó durante 30 min con el tampón de separación a la temperatura de trabajo, que fue de 23°C. Las áreas de los picos fueron corregidas dividiéndolas por los respectivos tiempos de migración; con este fin, se hizo uso de la correspondiente opción del software. El análisis por vía enzimática se realizó haciendo uso de un espectrofotómetro de fila de diodos (Modelo 8452A, Hewlett-Packard), conectado mediante una interfase HPIB a un ordenador PC 486/66 MHz. Para las medidas de pH se empleó un potenciómetro Crison modelo micropH 2000 provisto de un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl.

IV.2.3. Material vegetal

Una parte de las plantas vasculares, perejil y espinaca, fueron adquiridas en diferentes supermercados locales y analizadas el mismo día de la compra. Otra parte de las muestras de perejil y espinaca se cultivaron en el laboratorio y se analizaron el mismo día de su recolección. Los líquenes *Parmelia acetabulum* (Necker) Duby, *Parmelia quercina* (Willd.) Vainio y *Hypogymnia tubulosa* (Schaerer) Havaas, y briófitos *Hypnum cupressiforme* (Hedw.) Gaertn, *Tortula ruralis* (Hedw.) Gaertn., Meyer & Scherb., así como las hepáticas *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff y *Frullania dilatata* (L.) Dum., fueron recolectados de sus hábitats específicos en Sierra del Toro

(Castellón, España, UTM 305XK8719) en su estado de humedad natural en Febrero de 1998. Estas muestras fueron inmediatamente transportadas al laboratorio y analizadas dentro de la misma semana de recolección.

IV.2.4. Tratamiento de muestras y reducción del DHA

Las muestras de plantas vasculares y no vasculares se lavaron abundantemente con agua destilada para eliminar el polvo y, en el caso de las no vasculares, para quitar los restos del sustrato al que están adheridas. En las muestras de perejil y espinaca se desechó el peciolo y las venas. Inmediatamente después se procedió a congelar las muestras con nitrógeno líquido. En este estado, se pulverizaron y luego se homogeneizaron con MPA al 2% en un mortero de porcelana rodeado de un baño de hielo. La relación de masa vegetal pesada-volumen de MPA fue de 0.5 g (peso seco):8 ml para líquenes, briófitos y hepáticas, y de 2 g (peso fresco):12 ml para perejil y espinaca. Para eliminar el material no disuelto, las mezclas se centrifugaron a 6000 *g* a 4°C durante 2 min, y el líquido claro sobrenadante se pasó por un filtro de 5 µm (Mitex, Millipore, Bedford, MA), inyectándose una alícuota en el capilar.

Para determinar AAT, se tomó una alícuota de 0.5 ml del extracto filtrado y se agitó suavemente con 30 mg de DL-homocisteína hasta disolución completa de esta última. Se añadieron 30 µl de NaOH 2 M obteniéndose un pH final próximo a 7. La mezcla se inyectó inmediatamente, y se calculó la concentración de DHA como la diferencia entre AAT y AA.

IV.2.5. Procedimientos de CZE y enzimático

En el análisis de AA por CZE, se utilizó como electrolito soporte un tampón de sodio dihidrógeno fosfato 60 mM, conteniendo la cantidad necesaria de NaOH 0.1 M para alcanzar pH 7, y conteniendo también NaCl 60 mM y HDM al 0.0001 %. La separación tuvo lugar aplicando un voltaje de -15 kV a una temperatura constante de 23°C. Tanto las muestras como los estándares se inyectaron ejerciendo una presión de 50 mbar durante 2 s. La longitud de onda de detección fue de 265 nm. Entre inyecciones sucesivas, el capilar se regeneró hidrodinámicamente con el electrolito soporte durante 10 min, para lo cual se ejerció una presión de 1015 mbar. Las eficacias se calcularon como:

$$N = 5.54\left(\frac{t_m}{w_{1/2}}\right)^2$$

donde t_m es el tiempo de migración y $w_{1/2}$ es la anchura del pico a media altura.

La determinación enzimática de AA se realizó monitorizando con el espectrofotómetro la disminución de absorbancia a 265 nm, la cual se produce al añadir ascorbato-oxidasa a causa de la oxidación del AA a DHA [31]. Las porciones de prueba contenían 1 ml de extracto vegetal o de disolución estándar, y 2 ml de tampón fosfato 100 mM (pH 6.8). La oxidación del AA se lleva a cabo mediante la adición de sucesivas alícuotas de 10 µl de una disolución de 0.25 unidades μl^{-1} de ascorbato-oxidasa. La absorbancia decrece a medida que se adicionan nuevas alícuotas, hasta que finalmente permanece constante. La diferencia de absorbancias inicial y final es proporcional a la concentración de AA.

IV.3. Resultados y discusión

IV.3.1. Estudios preliminares

Se estudió la estabilidad de las disoluciones de AA en MPA al 2 % a 4°C. La reducción de la absorbancia del pico de AA por un período de tres días fue menor del 1 %. Por tanto, los estándares y los extractos se prepararon, almacenaron e inyectaron en presencia de un 2 % de MPA en frío. En medio ácido fuerte y débil, las disoluciones de la forma protonada no cargada del AA (log K = 4.17) [16] son relativamente estables, mientras que en medio alcalino aumenta rápidamente el riesgo de oxidación [16]. Se seleccionó un BGE de pH 7 como un compromiso entre mantener el AA en forma aniónica durante la separación, dotándolo así de movilidad electroforética, y reducir al mismo tiempo, en lo posible el riesgo de oxidación.

Con el fin de obtener bajos tiempos de migración para el AA se decidió trabajar con polaridad negativa, y con un EOF próximo a cero o invertido. Para eliminar o invertir el EOF se estudiaron varios recubrimientos del capilar, tanto estáticos como dinámicos. Entre los primeros, se ensayó el recubrimiento con acrilamida [64]. Usando un tampón fosfato 20 mM a pH 7 y una tensión de -15 kV, se observó el pico del AA, que presentó un tiempo de migración inferior a 5 min. Sin embargo, diferentes capilares produjeron variaciones importantes del tiempo de migración, lo que se atribuyó a una falta de reproducibilidad en la elaboración del recubrimiento del capilar con acrilamida. Por esta razón, se prefirió emplear recubrimientos dinámicos, seleccionando finalmente el HDM. Este polímero ha mostrado ser muy efectivo para reducir e invertir el flujo electroosmótico, incluso a concentraciones muy bajas [65].

Se ha recomendado añadir una disolución concentrada de monohidrógeno fosfato potásico a los extractos conteniendo MPA antes de la reducción del DHA con DL-homocisteína; se supone que la adición de esta sal reduce la acidez de las disoluciones de MPA, facilitando la reducción del DHA [66-68]. Sin embargo, con

este procedimiento, no se observó pico alguno debido al AA, lo que puede ser debido al efecto anti-hacinado (*anti-stacking*) producido por la excesiva fuerza iónica.

Para evitar en lo posible el aumento de la fuerza iónica, se aumentó el pH con NaOH 2 M, en lugar de utilizar K_2HPO_4. Además, con el fin de evitar la oxidación del DHA en medios neutros y alcalinos, la DL-homocisteína se agregó antes que el NaOH. El pH final de la mezcla, próximo a 7, aumentó muy poco cuando se adicionó un mayor volumen de NaOH 2 M, lo que indica una alta capacidad amortiguadora de la mezcla. Esta capacidad amortiguadora puede explicarse en base a la presencia de cantidades importantes de ácido ortofosfórico libre en las disoluciones de MPA. Tras la inyección, y empleando el BGE recomendado, las disoluciones neutralizadas con NaOH 2 M no mostraron pérdida de eficacia en el pico del AA. Además, inyecciones consecutivas no mostraron pérdidas de sensibilidad por lo menos durante 20 min tras la reducción; sin embargo, las disoluciones inyectadas a los 40 min después del tratamiento con DL-homocisteína y NaOH mostraron pérdidas de un 30 %.

Para estimar la recuperación de AA durante la reducción, se preparó una disolución de 10 $\mu g\ ml^{-1}$ de AA an agua, y se añadió hasta un 2% de H_2O_2. La inyección de alícuotas sucesivas de esta disolución mostró una pérdida de AA de alrededor de un 60 % en 3 h. La adición de DL-homocisteína y NaOH al cabo de las 3 h mostró una recuperación del 97 ± 1 % (n = 3). También, se realizaron experiencias con disoluciones de DHA recién preparadas a partir de DHA sólido, obteniéndose recuperaciones del 80 %. La menor recuperación obtenida en este caso se atribuyó a la baja pureza del DHA sólido [60].

IV.3.2. Optimización de las condiciones de separación

Se estudió la influencia de la concentración de fosfato sobre el tiempo de migración y la eficacia del pico del AA, manteniendo constante la concentración de HDM (1×10^{-4} %). En la Tabla IV.1 se muestran los tiempos de migración, su desviación típica y el número de platos teóricos del pico de AA para los diferentes tampones empleados. Al aumentar la concentración de fosfato disminuyó el tiempo de migración, y se observó un aumento de la eficacia, sin embargo, también aumentó el ruido de fondo. Teniendo en cuenta estos factores, en los experimentos siguientes se decidió utilizar fosfato 60 mM. No se observó un aumento significativo del número de platos teóricos cuando se añadió ácido bórico en concentraciones crecientes, hasta 80 mM.

Como también se muestra en la Tabla IV.1, la eficacia mejoró notablemente tras la adición de NaCl al tampón. Los extractos empleados en las determinaciones de AA y AAT contienen concentraciones elevadas de MPA y metafosfato sódico, respectivamente. Por ello, la adición de NaCl al tampón mejoró el hacinamiento (*stacking*), efecto que se produce cuando la conductividad del electrolito soporte es mayor que la conductividad de las muestras. Debe tenerse en cuenta que el hacinamiento es óptimo cuando la conductividad del BGE es entre 5 y 10 veces mayor que la conductividad de la muestra.

Es interesante indicar que un aumento en la concentración de NaCl tuvo un mayor efecto sobre la eficacia que un aumento equivalente en la concentración de NaH_2PO_4. Los experimentos posteriores se realizaron con un electrolito conteniendo fosfato 60 mM y NaCl 60 mM a pH 7. Concentraciones superiores de NaCl condujeron a corrientes muy elevadas y a una pérdida notable de reproducibilidad. Cuando se adicionaron concentraciones crecientes de HDM, en el intervalo de 1×10^{-4} a 5×10^{-3} %, el tiempo de migración del AA disminuyó desde 2.9 a 2.0 min, sin que

se produjera un aumento apreciable de eficacia. Con un 1×10^{-4} % de HDM se obtuvo un EOF estable, que no varió apreciablemente durante más de 60 inyecciones.

Tabla IV.1. Tiempo de migración y eficacia del pico de AA con distintos BGEs.

Fosfato (mM)	NaCl (mM)	t (min)	$Nx10^3$
20	0	13.3 ± 0.4	9
20	60	5.0 ± 0.3	57
20	100	3.8 ± 0.6	77
40	0	8.5 ± 0.2	17
60	0	4.9 ± 0.2	27
70	0	4.0 ± 0.2	32
60	20	4.07 ± 0.04	43
60	40	3.225 ± 0.008	59
60	60	2.88 ± 0.05	76

IV.3.3. Aplicación a muestras reales, parámetros de calidad y validación

La curva de calibrado se realizó inyectando seis estándares de AA en concentración creciente, hasta 100 μg ml^{-1}. Utilizado el área corregida (área del pico dividida por su tiempo de migración) se obtuvo una recta con un coeficiente de correlación lineal de $r^2 > 0.9998$. La sensibilidad, el límite de detección (LOD, *limit of detection*), la repetitividad y la reproducibilidad, tanto para el área corregida como para el tiempo de migración, se muestran en la Tabla IV.2. El LOD se calculó como 3 veces el ruido de fondo dividido por la sensibilidad. El ruido de fondo, s, se obtuvo de dos formas: (i) suponiendo que la anchura de la línea base en la región del pico es

5s; y (ii) como la desviación estándar de una serie de 10 inyecciones de concentración 10 $\mu g\ ml^{-1}$. Ambos procedimientos condujeron al mismo LOD.

Tabla IV.2. Parámetros de calidad para el método de CZE.

Parámetro	Valor
Sensibilidad, $\mu g^{-1}\ ml\ mUA^{-1}$	3.1×10^{-3}
Repetitividad del área corregida, % (n = 10, 10 $\mu g\ ml^{-1}$)	0.9
Repetitividad del tiempo de migración, % (n = 10, 10 $\mu g\ ml^{-1}$)	0.8 [a]
Reproducibilidad del área corregida, % (n = 8, 10 $\mu g\ ml^{-1}$, 8 días)	1.2
Reproducibilidad del tiempo de migración, % (n = 8, 10 $\mu g\ ml^{-1}$, 8 días)	1.1 [a]
LOD con disoluciones de estándar, $\mu g\ ml^{-1}$	0.2
LOD en plantas vasculares, mg/100g de peso fresco	0.12
LOD en plantas no vasculares, mg/100g de peso seco	0.3

[a] Como desviación estándar relativa.

Los extractos de los vegetales indicados en la Tabla IV.3 se analizaron utilizando ambos procedimientos: el propuesto, que hace uso de la CZE, y el método enzimático [31]. Como se observa en la Figura IV.1, en los diferentes extractos aparecieron varios picos correspondientes a solutos desconocidos. La identificación del AA se realizó haciendo uso del tiempo de migración y del espectro de absorción UV en el máximo del pico; los datos se compararon con los obtenidos inyectando estándares. También se inyectaron muestras aditivadas con AA, observándose el aumento correspondiente del pico del AA. Además, en todos los extractos, el pico del AA apareció bien separado respecto a otros picos de la matriz. Por otra parte, en

comparación con la inyección de estándares, la línea base a ambos lados del pico del AA no experimentó un aumento del ruido de fondo al inyectar los extractos. Por ello, el LOD fue el mismo, tanto para estándares como para extractos vegetales.

Tabla IV.3. Concentraciones de AA encontradas en varias plantas por los métodos de CZE y enzimático[a]

Muestra	CZE	M. enzimático
Perejil (cultivado)	258	---[b]
Espinaca (mercado local)	57.4	57.2
Espinaca (cultivada)	81.7	80.7
Parmelia acetabulum	2.94	2.95
Parmelia quercina	1.82	1.84
Hypogymnia tubulosa	6.21	6.02
Hypnum cupressiforme	5.43	5.38
Tortula ruralis	10.5	---[b]
Porella platyphylla	4.47	---[b]
Frullania dilatata	1.79	1.85

[a] En mg de AA por 100 g de muestra fresca y muestra seca en plantas vasculares y no vasculares, respectivamente.

[b] El método enzimático no puede aplicarse debido a la alta absorbancia de los extractos.

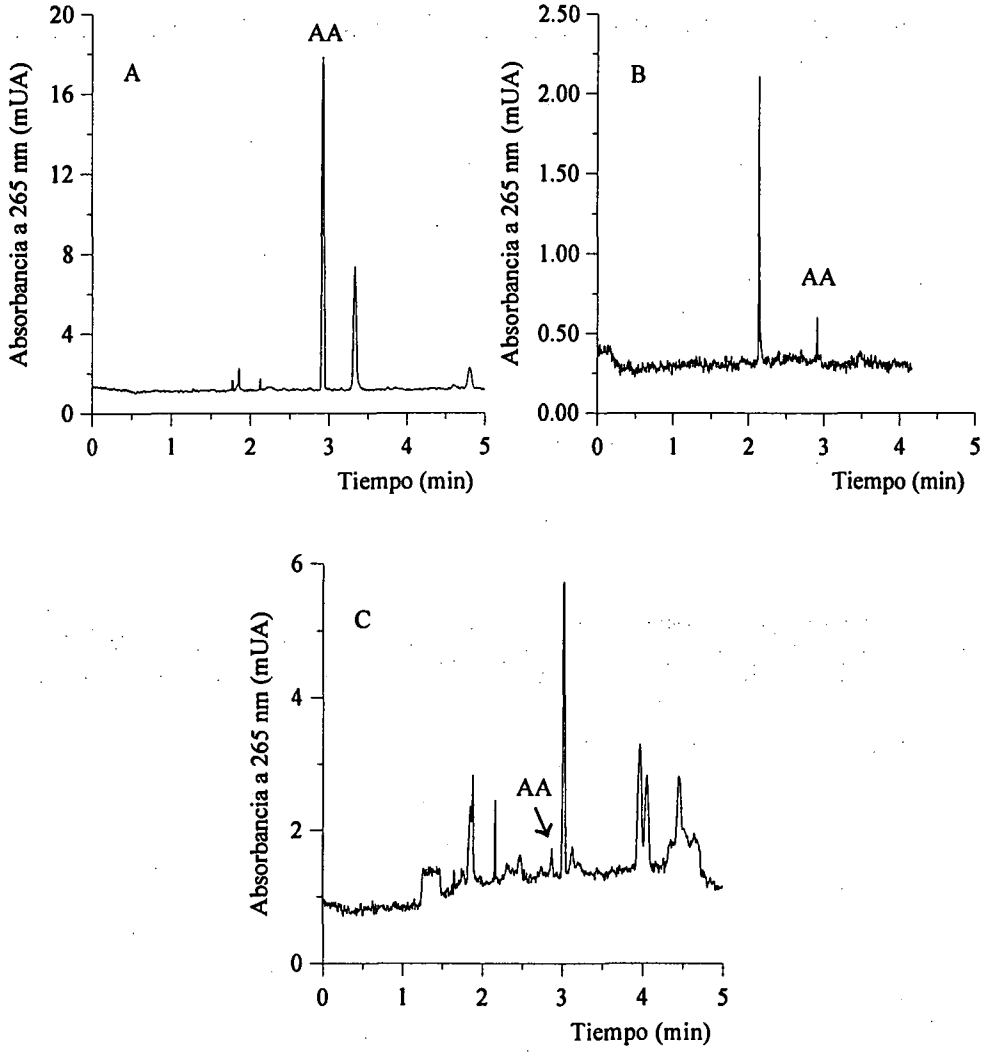


Figura IV.1. Electroferogramas de extractos de plantas; concentraciones de AA encontradas en los extractos: (A) espinaca, 95.8 μg ml^{-1}; (B) líquen *Parmelia acetabulum*, 1.8 μg ml^{-1}; y (C) briófito *Tortula ruralis*, 6.5 μg ml^{-1}.

Además, se prepararon curvas de calibrado mediante el método de las adiciones de estándar. Para ello, sobre los extractos se adicionaron tres disoluciones con concentraciones crecientes de AA, hasta 100 μg ml^{-1}. Las curvas fueron lineales con $r^2 > 0.998$, y en todos los casos, las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas mediante el método de las adiciones de estándar fueron iguales que las pendientes obtenidas mediante calibrado externo. Este resultado es condición necesaria, aunque no suficiente, para que el método esté exento de efecto matriz. Sin embargo, con este resultado es muy probable que el método propuesto esté efectivamente exento de efecto matriz, aunque no se tenga una garantía absoluta sobre este extremo.

Para obtener las curvas de calibrado por el procedimiento enzimático, se emplearon tres disoluciones patrón de AA en concentraciones crecientes, hasta 50 μg ml^{-1}. Se utilizó tanto el método de calibrado externo, como el de adiciones de estándar. Se obtuvieron líneas rectas con $r^2 > 0.998$. Como se muestra en la Tabla IV.3, los procedimientos CZE y enzimático proporcionaron valores similares para todas las muestras. La aplicación de la prueba estadística para una serie de pares de datos no mostró diferencias significativas para un nivel de confianza del 95 %. Cuando el extracto era fuertemente coloreado, como ocurrió con perejil, *Tortula ruralis* y *Porella platyphylla*, la alta absorbancia inicial a 265 nm impidió la aplicación del método enzimático.

Las concentraciones de AA encontradas en plantas vasculares fueron similares a las indicadas en la bibliografía. La concentración más alta de AA dada por la espinaca cultivada con respecto a la comprada en el supermercado local puede atribuirse al tiempo más corto transcurrido entre la recolección y el tiempo de análisis.

Los líquenes, briófitos y hepáticas mostraron concentraciones inferiores de AA respecto a las plantas vasculares. En líquenes, la menor concentración de AA puede ser atribuida al menor peso del fotobionte (algas), respecto al mayor peso de los hongos, que están casi desprovistos de AA. En ciertas especies de líquenes, tales como *Parmelia sulcata*, la población celular de algas endosimbióticas puede

representar tan sólo entre un 10 y un 15% del peso total del talo [69]. En el caso de briófitos y hepáticas, la concentración inferior de AA se puede atribuir a su metabolismo más lento.

Los resultados de la determinación de AA y DHA, y de la relación AA/AAT, en espinaca, en un líquen y en una hepática se muestran en la Tabla IV.4. El valor obtenido para la espinaca es similar a los encontrados en la bibliografía [31]. El procedimiento enzimático no pudo aplicarse en algunos casos a causa de la excesiva absorbancia de los extractos (ver Tabla IV.3).

Tabla IV.4. Concentraciones de AA y AAT encontradas en varias plantas por el método de CZE

Muestra	AA[a]	TAA[a]	AA/TAA
Espinaca	40.9	50.7	0.81
Parmelia quercina	2.49	4.33	0.58
Frullania dilatata	3.61	35	0.1

[a] En mg de AA por 100 g de muestra fresca y muestra seca, en plantas vasculares y no vasculares, respectivamente.

IV.4. Referencias

1. U. Heber, C. Miyake, J. Mano, C. Ohno y K. Asada, Plant Cell Physiol., 37 (1996) 1066.
2. L.W. Mapson, The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol. 1 (Food Science Technology, a Series of Monographs), ed. A.C. Hulme, Academic Press, Londres, 1970, págs. 369-384.
3. G.M. Jaffe, Handbook of Vitamins, ed. J.L. Machlin, Marcel Dekker, Nueva York, 1984, págs. 199-244.
4. P.L. Conklin, E.H. Williams y R.L. Last, Proc. Natl. Acad. Sci., 93 (1996) 9970.
5. O. Arrigoni, J. Bioenerg. Biomemb., 26 (1994) 407.
6. C. Neubauer y H. Yamamoto, Photosynth. Res., 39 (1994) 137.
7. G. Forti y A.M. Eherenheim, Biochim. Biophys. Acta, 1183 (1993) 408.
8. P. Navas, J.M. Villalba y F. Cordoba, Biochim. Biophys. Acta, 1197, (1994) 1.
9. C. Foyer, Antioxidants in Higher Plants, eds. R.G. Alscher y J.L Hess, CRC Press, Boca Raton, FL, 1983, págs.31-58.
10. J.W. Anderson, C.H. Foyer y D.A. Waiker, Planta, 158 (1983) 442.
11. A.A.F. Rautenkranz, L. Li, F. Machier, E. Martinoia y J.J. Oertli, Plant Physiol., 106 (1994) 187.
12. R.C. Wittes, New. Engl. J. Med., 312 (1985) 178.
13. B. Borenstein, Food Technol., 41 (1987) 98.
14. A. Bendich, Food Technol., 41 (1987) 112.
15. K. Mikova y J. Davidele., Chem. Listy, 68 (1974) 715.
16. H.E. Sauberlich, M.D. Green y S.T. Omaye, Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses, eds. P.A.Seib y B.M.Tolbert, American Chemical Society, Washington, DC, 1982, págs. 199-221.
17. J.F. Fleming y K.G. Bensch, Int. J. Pept. Protein Res., 22 (1983) 355.

18. P.W. Washko, W.O. Hartzell y M. Levine, Anal. Biochem., 181 (1989) 276.
19. M.R.H. Lowik, J. Schrijver y M. Wedel, Int. J. Vit. Nutr. Res., 61 (1991) 43.
20. J.M. Kim, K. Huang y R.D. Schmid, Anal. Lett., 23 (1990) 2273.
21. A. Sano, T. Kuwayama y M. Furukawa, Anal. Sci., 11 (1995) 405.
22. A. Jain, A. Chaurasia y K.K. Verma, Talanta, 42 (1995) 779.
23. H.P. Huang, R.X. Cai,Y.M. Du y Y.E. Zeng, Anal. Chim. Acta, 309 (1995) 271.
24. T.R. Ruiz, C.M. Lozano y A. Sanz, Anal. Chim. Acta, 308 (1995) 299.
25. S.P. Arya y M. Mahajan, Anal. Sci., 11 (1995) 853.
26. O.H. Abdelmageed, P.Y. Khashaba, H.F. Askal, G.A. Saleh y I.H. Refaat, Talanta, 42 (1995) 573.
27. M.U. Özgür y S. Sungur, Talanta, 42 (1995) 1631.
28. K.K. Hadady y I. Fabian, Anal. Lett., 28 (1995) 1421.
29. M.J. Esteve, R. Farré y A. Frígola, Fresenius J. Anal. Chem., 351 (1995) 804.
30. X. Hu. y Z. Leng, Anal. Lett., 28 (1995) 2263.
31. M.W.F. Luwe, U. Takahama y U. Heber, Plant Physiol., 101 (1993) 969.
32. R. Stevanato, L. Avigliano, A. Finazzi-Agro y A. Agro, Anal. Biochem., 149 (1985) 537.
33. T.Z. Liu, N. Chin, M.D. Kiser y W.N. Bigler, Clin. Chem., 28 (1982) 2225.
34. R.C. Rose y D. Nahrwold, Anal. Biochem., 123 (1982) 389.
35. L.L. Lloyd, F.P. Warner, J.F. Kennedy y C.A. White, J. Chromatogr., 437 (1988) 447.
36. L.L. Lloyd, F.P. Warner, J.F. Kennedy y C.A. White, Food Chem., 28 (1988) 257.
37. M.C. Gennaro y C. Abrigo, Fresenius J. Anal. Chem., 340 (1991) 422.
38. S. Zapata y J.R. Dufour, J. Food Sci., 57 (1992) 506.
39. X. Chen y M. Sato, Anal. Sci., 11 (1995) 749.
40. H.J. Kim y Y.K. Kim, J. Food Sci., 53 (1988) 1525.
41. H.P. Wagner y M.J. McGarrity, J. Chromatogr., 546 (1991) 119.

42. W.D. Graham y D. Annette, J. Chromatogr., 594 (1992) 187.
43. T. Ito, H. Murata, Y. Yasui, M. Matsui, T. Sakai y K. Yamauchi, J. Chromatogr. B, 667 (1995) 355.
44. Y. Miura, T. Maruyama y T. Koh, Anal. Sci., 11 (1995) 617.
45. H.G. Daood, P.A. Biacs, M.A. Dakar y F. Hajdu, J. Chromatogr. Sci., 32 (1994) 481.
46. R. Leubolt y H. Klein, J. Chromatogr. A, 640 (1993) 271.
47. A. Baldesten, S.G. Hjalmarsson y G. Neumann, Fresenius Z. Anal. Chem., 290 (1978) 148.
48. T. Tsuda y H. Fukuba, J. Micronutr. Anal., 4 (1988) 217.
49. S. Fujiwara, S. Iwase y S. Honda, J. Chromatogr., 447 (1988) 133.
50. P.A. Marshall, V.C. Trenerry y C.O. Thompson, J. Chromatogr. Sci., 33 (1995) 426.
51. C.O. Thompson y V.C. Trenerry, Food Chem., 53 (1995) 43.
52. B.L. Ling, W.R.G. Baeyens, P.V. Acker y C. Dewaele, J. Pharm. Biomed. Anal., 10 (1992) 717.
53. E.V. Koh, M.G. Bissell y R.K. Ito,(1993) J. Chromatogr., 633 (1933) 245.
54. M. Chiari, M. Nesi, G. Carrea y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 645 (1993) 197.
55. U. Jegle, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 495.
56. J. Schiewe, Y. Mrestani y R. Neubert, J. Chromatogr. A, 717 (1995) 255.
57. M.W. Davey, G. Bauw y M. Van Montagu, Anal. Biochem., 239 (1966) 8.
58. K. Fukushi, S. Takeda, S.I. Wakida, M. Yamane, K. Higashi y K. Hiiro, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 313.
59. O.K. Choi y J.S. Jo, J. Chromatogr. A, 781 (1997) 435.
60. M.W. Davey, G. Bauw y M. Van Montagu, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 269.
61. C.H. Wu, Y.S. Lo, Y.H. Lee y T.I. Lin, J. Chromatogr. A, 716 (1995) 291.
62. A. Prochazkova, L. Krivankova y P. Bocek, Electrophoresis, 19 (1988) 300.

63. S. Honda, Y. Naitoh-Ohta, K. Togashi y A. Taga, Anal. Sci., 13 (1977) 557.

64. S. Hjerten, J.Chromatogr., 347 (1985) 191.

65. M.T. Galceran, L. Puignou y M. Diez, J. Chromatogr. A, 732 (1996) 167.

66. H. Iwase y I. Ono, J. Chromatogr. A, 654 (1993) 215.

67. W.A. Behrens y R. Madere, Anal. Biochem., 165 (1987) 102.

68. D.B. Dennison, T.G. Brawley y G.L.K. Hunter, J. Agric. Food. Chem., 29 (1981) 927.

69. R. Honegger, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 42 (1991) 553.

V. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO, GLUTATIÓN Y SUS FORMAS OXIDADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL EN PLANTAS VASCULARES EXPUESTAS A LA ACCIÓN DEL OZONO

CAPÍTULO V

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO, GLUTATIÓN Y SUS FORMAS OXIDADAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL EN PLANTAS VASCULARES EXPUESTAS A LA ACCIÓN DEL OZONO

Capítulo publicado en Environmental Science and Technology (Anexo III).

Resumen

Se propone un procedimiento de electroforesis capilar zonal (CZE) para la separación de ácido ascórbico (AA), glutatión (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en plantas vasculares en una inyección y desarrollo electroforético únicos. El electrolito de fondo (BGE) está constituido por un tampón fosfato de pH 7, conteniendo bromuro de hexadimetrina para controlar dinámicamente el flujo electroosmótico. La separación se realiza en menos de 5 min. La señal se monitoriza simultáneamente a 265 y 200 nm. En otra alícuota del mismo extracto, y previa reducción con DL-homocisteína, se determina ácido dehidroascórbico (DHA). Los límites de detección de AA, GSH y GSSG se hallan en el intervalo 0.2 - 0.8 $\mu g\ ml^{-1}$, que corresponde a 0.04 - 0.16 mg por 100 g de peso fresco de hojas de tomate, sandía y patata. Las plantas expuestas a altas concentraciones de ozono (1600 $\mu g\ m^{-3}$), en un sistema de fumigación de laboratorio durante 1, 2, 3, y 5 h, muestran estrés oxidativo progresivo inducido por el ozono. El estrés produce una reducción simultánea de los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG); sin embargo, para plantas cultivadas en el campo, en cámaras abiertas por arriba, y sometidas durante unos 50 días a concentraciones de ozono mucho más bajas (concentraciones medias, 10 y 80 $\mu g\ m^{-3}$),

la velocidad de reducción fue mayor para el cociente AA/(AA+DHA) que para el GSH/(GSH+GSSG).

Palabras clave: ácido L-ascórbico; glutatión; estrés oxidativo; electroforesis capilar zonal.

V.1. Introducción

El ambiente oxigenado de la vida aeróbica conduce inevitablemente a la producción de diversas especies químicas oxidantes, tales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno, peróxidos orgánicos, radical hidroxilo y otros radicales, todos ellos subproductos del metabolismo celular. La presencia de estas especies reactivas oxigenadas produce en las plantas estrés oxidativo. Entre los sistemas primarios que previenen o limitan los daños por oxidación, se encuentran los basados en antioxidantes no enzimáticos, tales como el ácido L-ascórbico (AA, vitamina C), el glutatión (GSH, γ-L-glutamil-L-cisteinilglicina) y el α-tocoferol (vitamina E).

Ambos, el AA y el GSH están universalmente presentes en la inmensa mayoría de células procarióticas y eucarióticas, donde experimentan interconversiones con sus formas oxidadas, ácido L-dehidroascórbico (DHA) y glutatión disulfuro (GSSG), respectivamente. Estos sistemas redox están implicados en una amplia serie de reacciones celulares [1-4]. Los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG) son de gran importancia como indicadores de la calidad ambiental [5]. Los factores que inducen estrés en las plantas, incluyendo tanto daños mecánicos como contaminación atmosférica, alteran estos cocientes.

Las concentraciones de AA y DHA en vegetales varían ampliamente, encontrándose generalmente los niveles más altos en tejidos y hojas en crecimiento [6]. Más del 3 % del peso fresco de ciertas frutas es AA [7]. Las células vegetales consumen activamente AA en varios procesos: (i) la eliminación de peróxido de hidrógeno y radicales libres oxígenados producidos por contaminantes atmosféricos

[5, 8]; (ii) la hidroxilación de residuos de prolina en cadenas polipeptídicas [9]; y (iii) la de-epoxidación de carotenoides en el ciclo de las xantofilas [10]. Adicionalmente, el AA juega un papel destacado en el control del transporte electrónico fotosintético y mitocondrial [11], y en el control de la división celular de las plantas [12]. Las concentraciones de AA en cloroplastos son altas, por ejemplo, alcanzan valores del orden de 50 mM en espinaca, lo cual está probablemente relacionado con su papel central en la fotosíntesis [4]. El AA se halla presente también en otros orgánulos celulares como el citosol, las vacuolas y la membrana celular [13, 14].

Se atribuyen numerosas funciones fisiológicas al GSH en las plantas [15], tales como la reserva de sulfuro en su forma reducida y la regulación de la expresión de algunos genes [16]. Además, el GSH está implicado en la regulación redox del metabolismo celular [17], y debido a la presencia de los grupos tiol, en la defensa de las plantas y otros organismos contra el estrés oxidativo [18]. Se cree que la concentración de GSH en el estroma del cloroplasto está cercana a 5 mM, lo suficientemente alta como para que el GSH pueda actuar como un importante tampón redox, previniendo la inactivación enzimática mediante la protección de los grupos tioles de las proteínas frente a la oxidación [19-21]. Se ha demostrado que una función específica del GSH es el mantenimiento de la reserva de ascorbato en las células de las plantas [21].

Para determinar AA y DHA (previa reducción a AA) en zumos de fruta y otros productos industriales, se han empleado métodos espectrofotométricos [22-31], polarografía diferencial de impulsos [32] y potenciometría de adsorción [33]. Sin embargo, estos métodos carecen de la adecuada sensibilidad, o de selectividad suficiente, para analizar extractos de plantas vasculares y no vasculares [22, 23]. Se han descrito procedimientos específicos basados en la oxidación de AA en presencia de ascorbato-oxidasa [34-36], y en técnicas de separación, incluyendo cromatografía de gases con derivatización pre-columna [37], HPLC en fase inversa [38-42], de exclusión iónica [43-47], de pares iónicos [48], y de intercambio iónico [49], así como isotacoforesis [50, 51] y otras técnicas de electroseparación capilar [52-66].

Se han desarrollado procedimientos de electroforesis capilar zonal (CZE) para la determinación de AA en vegetales y zumos de fruta [55-57,59-62,64]. Se han utilizado capilares recubiertos con poliacrilamida [55, 57] y con bromuro de tetradecil trimetilamonio [64]. También se ha utilizado cromatografía micelar electrocinética (MEKC) con un electrolito soporte (BGE) conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS) [52], o bien desoxicolato sódico (SDC) [53,54] para determinar AA en suplementos dietéticos vitaminados y en vegetales, respectivamente.

La mayoría de los métodos de HPLC y CZE para la determinación de GSH implican derivatización [67-70]. Así por ejemplo, se ha empleado N-etilmaleimida para bloquear el grupo tiol [71], realizándose la detección tanto espectrofotométrica como fluorimétricamente. No obstante, estos procedimientos son incompatibles con el análisis de ascorbato debido a la rápida oxidación del AA provocada por el ajuste del pH a valores neutro y alcalinos. Se han determinado simultáneamente GSH y GSSG sin derivatizar mediante HPLC y CZE utilizando detección electroquímica [72-74].

Se ha conseguido también determinar simultáneamente AA y GSH mediante HPLC [75] y CZE [63]. El procedimiento de Sofic y col. [75] conlleva tres inyecciones. En primer lugar, se inyecta directamente una alícuota para determinar AA y GSH; en segundo lugar, otra alícuota se incuba con glutatión reductasa y NADPH para determinar la suma GSH+GSSG; y finalmente, en una tercera alícuota, que previamente se ha sido tratada con ditiotreitol con el fin de reducir el DHA, se cuantifica la suma AA+DHA. Este procedimiento se aplicó a tejidos animales y vegetales. Davey y col. [63] usando un capilar de sílice no recubierto, y un BGE conteniendo un tampón borato 200 mM de pH 9, con un 20% (v/v) de acetonitrilo, fueron capaces de determinar AA, GSH y GSSG en extractos de plantas mediante una única inyección. Aunque también se observó un pico correspondiente al DHA, este analito no se pudo cuantificar.

En el capítulo anterior [76], se ha propuesto un procedimiento de CZE para la determinación de AA y de la suma AA+DHA (previa reducción de DHA con DL-homocisteína) en plantas vasculares y líquenes, briófitos y hepáticas. En este capítulo, se describe un procedimiento de CZE para la determinación de AA, DHA, GSH y GSSG. Se inyecta una alícuota para determinar AA, GSH y GSSG, monitorizando simultáneamente la señal a dos longitudes de onda. Para la cuantificación de AA+DHA, se trata una segunda alícuota con DL-homocisteína y se inyecta. Se analizaron plantas vasculares expuestas a estrés oxidativo, y los resultados se compararon con los obtenidos con plantas de control.

V.2. Parte experimental

V.2.1. Reactivos

Se prepararon disoluciones patrón de 250 μg ml^{-1} de AA, GSH y GSSG (Sigma, St Louis, MO, USA) en ácido metafosfórico al 2% (MPA, Aldrich, Milwaukee, WI, USA). Para prevenir la oxidación, estas disoluciones se prepararon a 4°C, y se conservaron a -20°C en la oscuridad. Se utilizaron hidróxido sódico, dihidrógeno fosfato sódico, cloruro sódico (Panreac, Barcelona), DL-homocisteína (Sigma) y bromuro de hexadimetrina (HDM, polímero que contiene alrededor de 25 a 50 unidades de hexadimetonio) (Fluka, Buchs, Suiza). Todas las soluciones se prepararon en agua desionizada (desionizador Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA), y antes de su inyección se desgasificaron en un baño de ultrasonidos durante 1 min, y se pasaron a través de un filtro de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro (MSI, Westboro, MA).

V.2.2. Aparatos

Se utilizó como en el Capítulo IV un sistema de electroforesis capilar HP ^{3D} (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). El capilar de sílice fundida empleado fue de 33.5 cm de longitud, 25 cm de longitud efectiva, y 50 µm de diámetro interno (Supelco, Bellefonte, USA). A su vez, el acondicionamiento de un capilar nuevo se realizó como se describe en el Capítulo IV. Al comienzo de cada sesión de trabajo, el capilar se acondicionó durante 30 min con el tampón de separación a la temperatura de trabajo, que fue de 23°C. Las áreas de los picos fueron corregidas dividiéndolas por los respectivos tiempos de migración; con este fin, se hizo uso de la correspondiente opción del software.

V.2.3. Material vegetal y experimentos de campo

Las especies empleadas: espinaca (*Spinacea oleracea*), sandía (*Citrullus lanatus*), patata (*Solanum tuberosum*) y tomate *(Lycopersicum esculentum*), fueron obtenidas y tratadas como se indica a continuación:

(i) La espinaca fue adquirida en un supermercado local, y analizada el mismo día.

(ii) Las plántulas de sandía, se obtuvieron mediante germinación de sus semillas sobre una mezcla comercial de suelo (vermiculita) en un invernadero. A las tres semanas de su plantación, se trasplantaron a macetas y se coloraron en una cámara abierta (OTC) mantenida bajo aire pasado por un filtro de carbón (CF, *charcoal filter*). La mitad de las plántulas fueron expuestas a plena luz solar, y la otra mitad a 50 % de luz solar. Pasadas tres semanas más, se recogieron y se analizaron.

(iii) Las patatas fueron cultivadas desde principios de Enero hasta mediados de Marzo en macetas, en el interior de las OTCs. Las plantas, se expusieron tanto a aire filtrado (CF) como a aire no filtrado, tomado directamente del ambiente (NF). Durante el proceso de desarrollo, la concentración de ozono en el lugar, fue controlada diariamente usando un monitor EPA (Modelo 1008, Dasibi, Glendale, CA, USA). El nivel medio de ozono durante el crecimiento de la patata estuvo alrededor de 10 $\mu g\ m^{-3}$ en las OTCs con CF y de 80 $\mu g\ m^{-3}$ en el caso de las NF. Este último valor excede ligeramente del valor estándar de la calidad del aire establecido por la Comunidad Europea y fijado en 65 $\mu g\ m^{-3}$ de ozono.

(iv) El tomate se germinó en un invernadero provisto con aire filtrado CF. Después de 20 días, las plantas se recogieron y expusieron a 1600 $\mu g\ m^{-3}$ de ozono empleándose el sistema de fumigación de laboratorio (LFS, *laboratory fumigation system*) que se describe a continuación.

V.2.4. Experimentos con sistema de fumigación de laboratorio

En la Figura V.1 se muestra un diagrama del LFS. Este sistema de fumigación consta de cuatro cubetas de 2.5 litros cada una, construidas en acero inoxidable recubierto de PTFE y provistas de tapas transparentes de vidrio. El LFS está provisto de un control preciso del flujo de aire que circula a través de las cubetas, de control continuo de otros parámetros ambientales (temperatura, luz), y de un sistema para la monitorización simultánea de la concentración del contaminante introducido con la corriente de aire.

Para minimizar los problemas de adsorción y desorción del ozono a los materiales con los que está construido el sistema, en todas las conexiones en contacto con gases se empleó acero inoxidable, PTFE o acero inoxidable recubierto de PTFE. Con objeto de que la corriente de aire mantuviese unos niveles de dióxido de carbono constantes, el aire se introducía inicialmente en un contenedor de plástico de 20 litros,

situado antes de la bomba de aspiración. Inmediatamente después de la bomba impulsora de aire, se situaba un filtro de carbón activo para eliminar los contaminantes de la corriente de aire. A continuación, el aire se burbujeaba a través de un frasco lavador conteniendo agua destilada a temperatura ambiente, con objeto de humedecerlo. Una trampa fría (Modelo KF 18/2, Walz, Alemania), regulaba el flujo de aire a su punto de rocío, 20.0 ± 0.1°C, resultando así una humedad relativa del 97 ± 1 % en las cubetas.

Después de su acondicionado, la corriente de aire se dividió en dos líneas o canales separados, uno para las cubetas de control y el otro para las fumigadas, estando montadas sobre cada canal dos cubetas en paralelo. Además, en la línea de control una de las cubetas se utilizaba para medir la temperatura y la humedad relativa, mientras que la otra albergaba las plantas de control. La humedad se controlaba mediante un sistema de medida del punto de rocío (Modelo TS, Walz), y la temperatura se medía mediante un termopar insertado en la cubeta. En la línea fumigada, el ozono se generaba haciendo pasar el flujo de aire a través de un ozonizador de luz UV (SIR, España). La concentración de ozono se registraba antes de la entrada en las cubetas mediante un analizador de ozono (Modelo 1008-RS, Dasibi). El control preciso del flujo de aire a través del sistema se lograba utilizando controladores másicos (5850 TR-series, Brooks Instruments, Holanda) y caudalímetros regulables, fijándose un valor de flujo de 2 L min^{-1} por cubeta. Las cubetas se mantuvieron siempre sumergidas en un baño termostatizado a 20.0 ± 0.1°C.

A continuación, las plantas se introdujeron en las cubetas de control (libres de ozono) y en las de fumigación, siendo expuestas a 1600 µg m^{-3} de ozono durante 1, 2, 3 y 5 horas. Los experimentos se realizaron de forma aleatorizada.

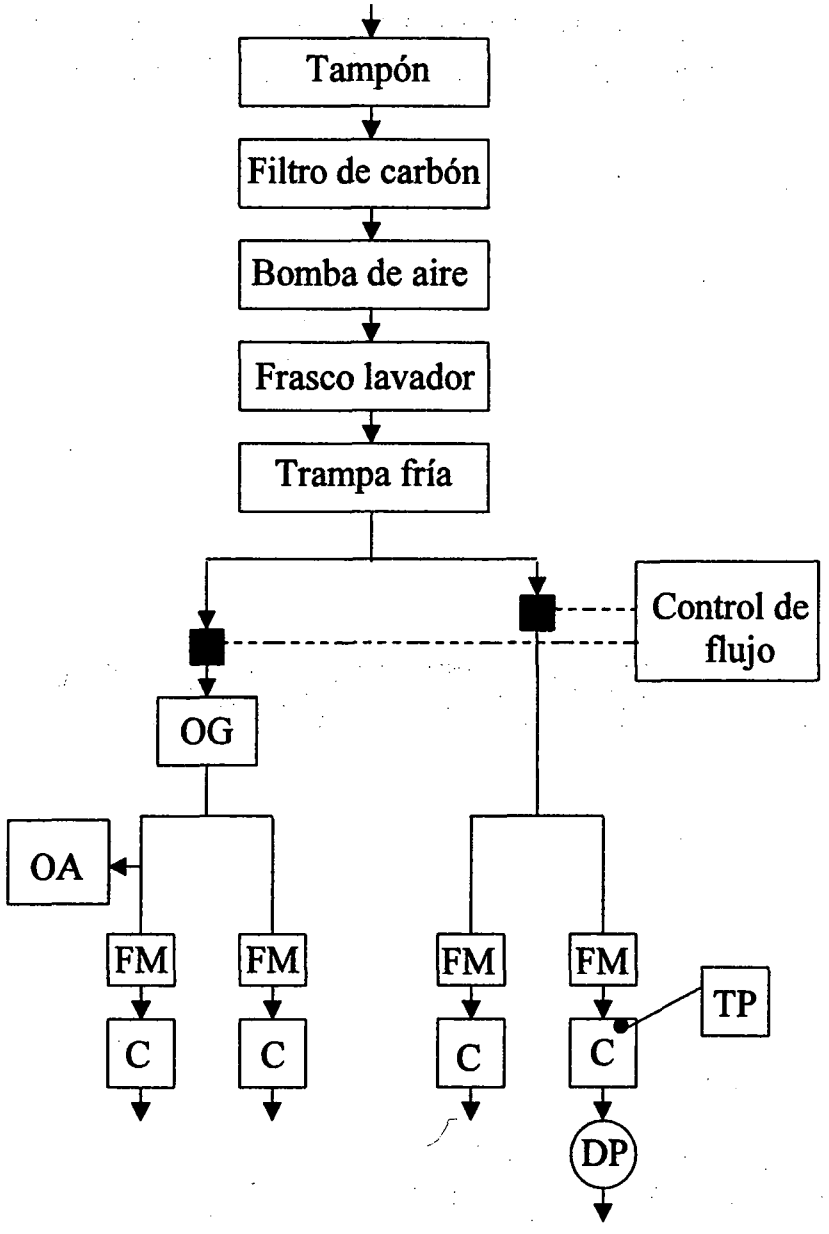


Figura V.1. Diagrama del sistema de fumigación de laboratorio (LFS). Símbolos: OG, generador de ozono; OA, analizador de ozono; FM, caudalímetro; C, cubeta; TP, sonda de temperatura; DP, sistema medidor del punto de rocío.

V.2.5. Preparación de las muestras para CZE

En todas las muestras se eliminaron el peciolo y las venas, e inmediatamente se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron. A continuación, se homogeneizaron con MPA al 2% en un mortero de porcelana rodeado de un baño de hielo. La relación de masa vegetal pesada-volumen de MPA fue de 2.0 g cada 12 ml para espinaca, y de 2 g cada 4 ml para tomate, sandía y patata. Para eliminar el material no disuelto, las mezclas se centrifugaron a 6000 *g* a 4°C durante 2 min, y el líquido sobrenadante se pasó por un filtro de 5 μm de diámetro de poro (Mitex, Millipore, Bedford, MA, USA), inyectándose una alícuota en el capilar.

Para determinar AA+DHA, se tomó una alícuota de 1.0 ml del extracto filtrado y se agitó suavemente con 100 mg de DL-homocisteína hasta disolución completa de esta última. Se añadieron 50 μl de NaOH 2 M obteniéndose un pH final próximo a 7. La mezcla se inyectó inmediatamente, y se calculó la concentración de DHA como la diferencia respecto a la concentración hallada de AA.

V.2.6. Procedimiento de CZE

La inyección de las muestras se realizó hidrodinámicamente (50 mbar durante 2 s). La separación electroforética se realizó aplicando un voltaje de -15 kV a 23°C. Como BGE se utilizó un tampón de sodio dihidrógeno fosfato 60 mM, con la cantidad necesaria de NaOH 0.1 M para alcanzar pH 7, y en presencia de NaCl 60 mM y HDM 0.0001 %. El HDM permite invertir el flujo incluso a concentraciones muy bajas [77]. Las longitudes de onda de detección fueron 265 nm para AA, y 200 nm para GSH y GSSG. Entre dos inyecciones sucesivas, el capilar se lavó con el electrolito soporte durante 10 min, utilizando para ello 1015 mbar.

V.3. Resultados y discusión

V.3.1. Estudios preliminares y de estabilidad

Los picos de AA, GSH y GSSG aparecieron a 3.2, 4.0 y 3.7 min, respectivamente. No se observó deriva significativa del flujo electroosmótico, ni de los tiempos de migración de los picos de los analitos, ni de las áreas de los mismos, en al menos 60 inyecciones. La recuperación del AA oxidado mediante la reducción con DL-homocisteína fue del 97 ± 1% (n=3) [76]. En los estudios de estabilidad se emplearon tanto las disoluciones estándar de AA, GSH y GSSG en MPA al 2%, como extractos de tomate y espinaca, también preparados en el mismo medio. Se estudió la estabilidad de los analitos, tanto en los extractos como en disoluciones estándar a 23°C, en un baño de hielo a 0°C y congelados a –20°C durante los periodos siguientes: 45 min, 24 horas y 20 días, respectivamente. Se realizaron siempre entre tres y seis medidas a intervalos regulares. En ningún caso se observaron variaciones significativas de las áreas de los picos para medidas realizadas a diferentes tiempos. Sin embargo, en los experimentos siguientes, las disoluciones estándar o los extractos de las muestras se analizaron inmediatamente, o bien se almacenaron durante pocas horas a 0°C, y siempre menos de una semana a –20°C, cuando fue necesario mantener la disolución por más tiempo.

V.3.2. Parámetros de calidad con estándares y análisis de plantas

En las Figuras V.2 y V.3 se muestran electroferogramas característicos de AA a 265 nm, y de GSH y GSSG a 200 nm, correspondientes a extractos de tomate de dos tipos: muestras de control y muestras fumigadas con ozono. Los picos de AA, GSH y GSSG en los extractos se identificaron mediante la comparación con los tiempos de migración de los correspondientes estándares, y en el caso del AA, también por comparación con el espectro de absorción del estándar. Además, también se

inyectaron alícuotas de los extractos sin y con la adición de pequeñas cantidades del patrón correspondiente, observándose en todos los casos un incremento de los picos.

Finalmente, cuando las plantas fueron tratadas con ozono, los picos de AA y GSH disminuyeron, mientras que el del GSSG aumentó, lo cual confirmó también la correcta asignación de los picos. En todos los casos, los picos de los tres analitos aparecieron bastante separados de los demás picos de la matriz.

Para construir las curvas de calibrado externo se utilizaron disoluciones patrón de 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 200 $\mu g\ ml^{-1}$ para AA, y de 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 150 $\mu g\ ml^{-1}$ para GSH y GSSG. También se inyectaron blancos. Se obtuvieron líneas rectas con $r^2 > 0.998$. La sensibilidad, la repetitividad (durante una jornada de trabajo) y reproducibilidad (durante 8 días) de los tiempos de migración y de las áreas corregidas de los picos, junto con el límite de detección (LOD), se muestran en la Tabla V.1. Para cada analito, el LOD se calculó como el cociente entre 3 veces la desviación estándar del área de un pico de baja concentración, s, y la pendiente de la curva de calibrado [78]. Los valores de la desviación estándar para AA, GSH y GSSG se obtuvieron inyectando 10 alícuotas de unos 10 $\mu g\ ml^{-1}$. Se obtuvieron los mismos LODs, tanto inyectando disoluciones estándar como extractos vegetales.

También se construyeron curvas de calibrado mediante el método de adiciones de estándar para AA, GSH y GSSG. Para ello, se adicionaron tres estándares con concentraciones crecientes de los analitos sobre los extractos, sin sobrepasar 100 $\mu g\ ml^{-1}$ de analito en el extracto aditivado. En todos los casos, se obtuvieron líneas rectas con ordenadas en origen estadísticamente iguales a cero y con $r^2 > 0.998$. Las pendientes no fueron significativamente distintas de las obtenidas mediante calibrado externo (ver Tabla V.1).

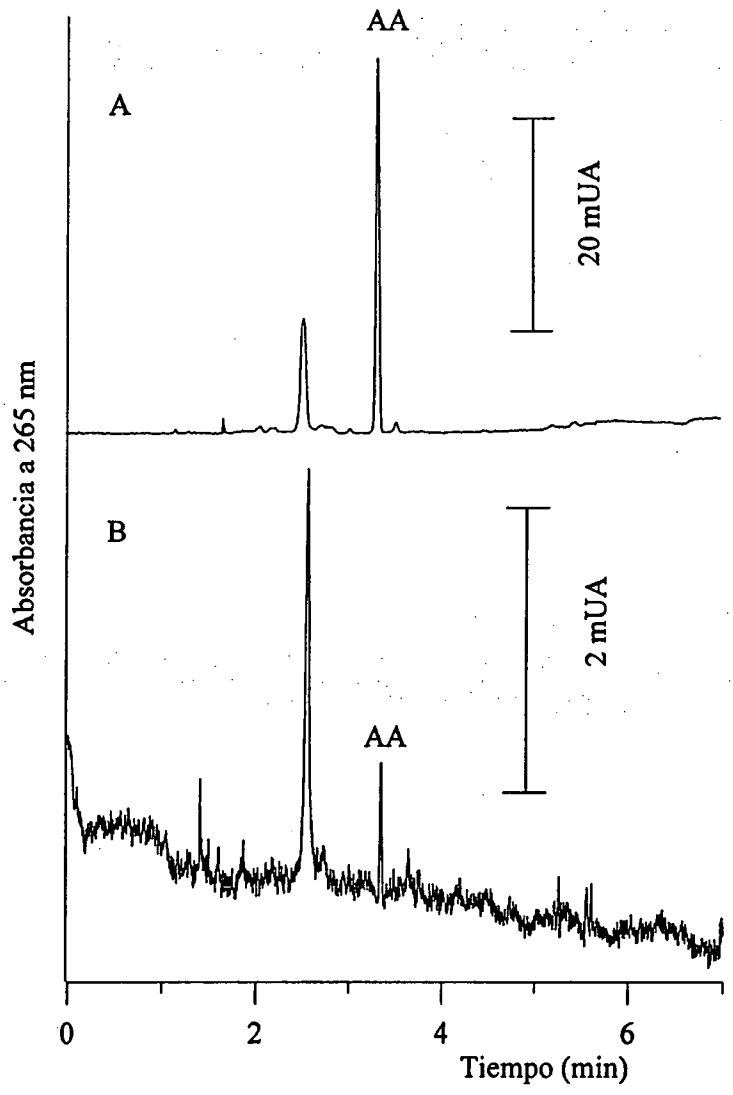


Figura V.2. Electroferogramas de extractos de tomate medidos a 265 nm: A, muestra de control; B, muestra expuesta durante 3 h a 1600 μg m^{-3} de ozono en el LFS.

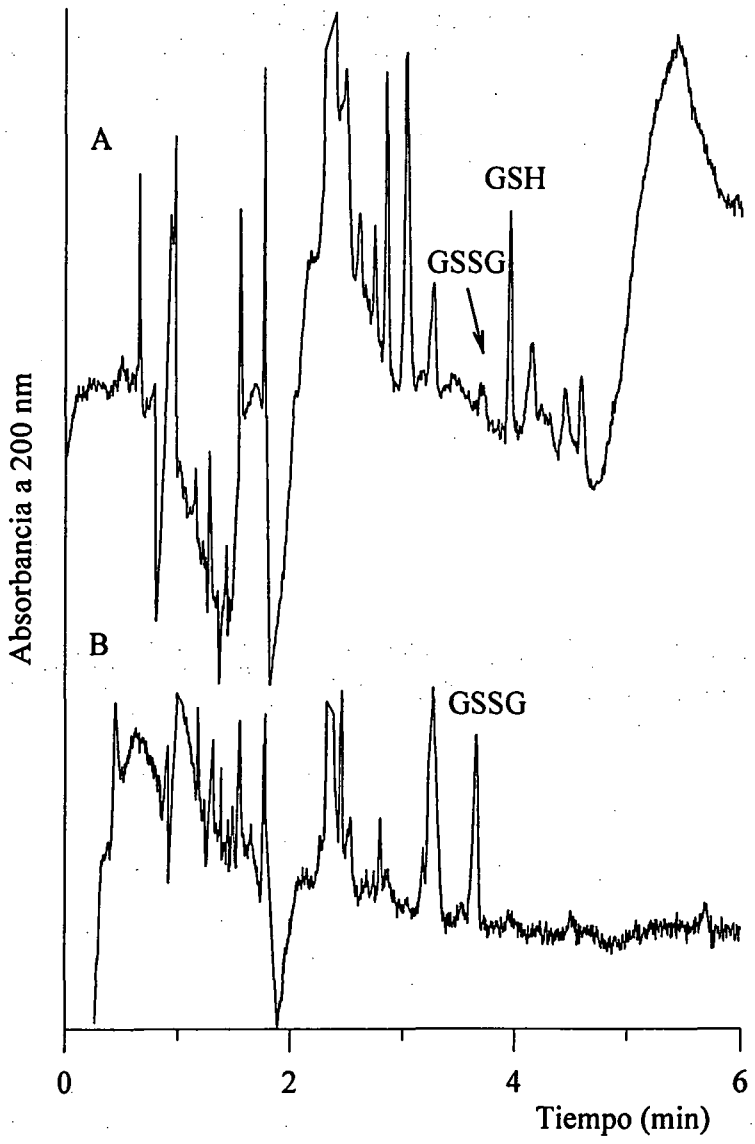


Figura V.3. Electroferogramas de extractos de tomate medidos a 200 nm: A, muestra de control; B, muestra expuesta durante 3 h a 1600 μg m^{-3} de ozono en el LFS.

Tabla V.1. Parámetros de calidad para AA, GSH y GSSG.

Parámetro	AA	GSH	GSSG
Sensibilidad (pendiente de la curva de calibrado)			
calibrado externo con estándares (n = 7)	3.1×10^{-3}	9.8×10^{-4}	1.6×10^{-3}
calibrado de adición estándar con extractos[a] (n = 4)	2.92×10^{-3}	9.54×10^{-4}	1.53×10^{-3}
Repetitividad del área corregida (desv. est. rel., n = 10)			
con estándares (10 $\mu g\ ml^{-1}$), %	0.9	1.4	1.5
con extractos[a], %	1.2	1.8	2.1
Repetitividad del tiempo de migracion (desv. est. rel. , n = 10)			
con estándares (10 $\mu g\ ml^{-1}$), %	0.8	1.7	1.5
con extractos[a], %	1.1	2.2	2.3
Reproducibilidad del área corregida (desv. est. rel., n = 8, 8 días)[b]			
con estándares, %	1.2	1.9	1.8
con extractos[a], %	1.5	2.7	2.8
Reproducibilidad del tiempo de migración (desv. est. rel., n = 8, 8 días)[b]			
con estándares, %	1.1	2.5	2.3
con extractos[a], %	1.4	3.2	3.4
LOD[c], $\mu g\ ml^{-1}$	0.2	0.8	0.6

[a] Media obtenida con extractos de espinaca y tomate a las concentraciones naturales de los analitos.

[b] Calculado a lo largo de 8 días consecutivos utilizando la misma disolución de estándar, o el mismo extracto vegetal; en cada caso, se introdujeron alícuotas en 8 viales que se congelaron a -20°C; se analizó una alícuota cada día.

[c] Expresado como concentración en el extracto; el factor de conversión para tomate, sandía y patata es 1 $\mu g\ ml^{-1}$ = 0.2 mg/100 g de peso fresco.

V.3.3. Perspectiva biológica

Las concentraciones de AA, DHA, GSH y GSSG encontradas, tanto en las muestras control como en las fumigadas, se muestran en la Tabla V.2. Desde una perspectiva biológica, el hecho de que las plantas expuestas al sol posean valores más altos en los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG) que las plantas cultivadas en la sombra, es consistente con la necesidad de una mayor capacidad de protección contra la luz, tal y como fue demostrado por Logan y col. [79]. Por otra parte, los cambios experimentados en las reservas de antioxidante en plantas de patata y tomate fumigadas, están de acuerdo con la función que desempeñan estas sustancias en la eliminación de ozono o de los radicales libres que la acción de éste produce.

En la Figura V.4 se muestran los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG) obtenidos para muestras de tomate de control y fumigadas con ozono. Los resultados muestran que ambos indicadores de estrés disminuyen progresivamente conforme aumenta el tiempo de fumigación. Por su parte, las muestras del control mantuvieron valores constantes de ambos cocientes. Estos resultados están de acuerdo con los datos indicados en la Tabla V.2, en los cuales los niveles de DHA y GSSG aumentaron a expensas de la disminución de sus correspondientes formas reducidas.

Para comparar adecuadamente las velocidades de relajación de ambos indicadores de estrés, se normalizaron los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG). Para ello, se dividieron los cocientes por sus máximos respectivos a tiempo de exposición cero, y se representaron frente al tiempo de exposición (resultados no mostrados). No se produjeron diferencias importantes entre las velocidades de relajación de ambos sistemas redox. Todo ello sugiere que las plantas experimentaron un severo estrés oxidativo debido a las altas concentraciones de ozono empleadas, y que la acumulación del contaminante superó la velocidad de regeneración de ambos, AA y GSH.

Tabla V.2. Concentraciones de AA, DHA, GSH and GSSG (mg / 100 g peso fresco), y cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG) en distintas especies vegetales sometidas a tratamiento.

Especies	Tipo de experimento y tratamiento	AA	DHA	AA/(AA+DHA)	GSH	GSSG	GSH/(GSH+GSSG)
Espinaca	Ninguno (muestras de mercado)	75.4	18.5	0.80	1.42	0.75	0.65
Sandía	OTC, 100% sol bajo aire CF	15.2	2.08	0.88	1.02	0.27	0.79
	OTC, sombra bajo aire CF	12.3	7.23	0.59	1.26	0.75	0.60
Tomate	LFS, control (n = 10)	22.7	6.04	0.79	1.52	0.65	0.70
	LFS, 0 h de exposición a ozono (n = 2)	22.5	5.25	0.81	1.48	0.57	0.72
	LFS, 1 h de exposición a ozono (n = 2)	8.34	19.4	0.30	0.76	1.30	0.37
	LFS, 2 h de exposición a ozono (n = 2)	5.02	22.8	0.18	0.29	1.77	0.14
	LFS, 3 h de exposición a ozono (n = 2)	0.33	27.5	0.012	ND[a]	1.87	-
	LFS, 5 h de exposición a ozono (n = 2)	0.14	27.6	0.0052	ND[a]	1.99	-
Patata	OTC, 100% sol bajo aire CF (n = 4)	1.944	16.04	0.1081	1.17	0.32	0.785
	OTC, 100% sol bajo aire NF (n = 4)	0.284	17.47	0.016	ND[a]	1.67	-

[a] ND = no detectado

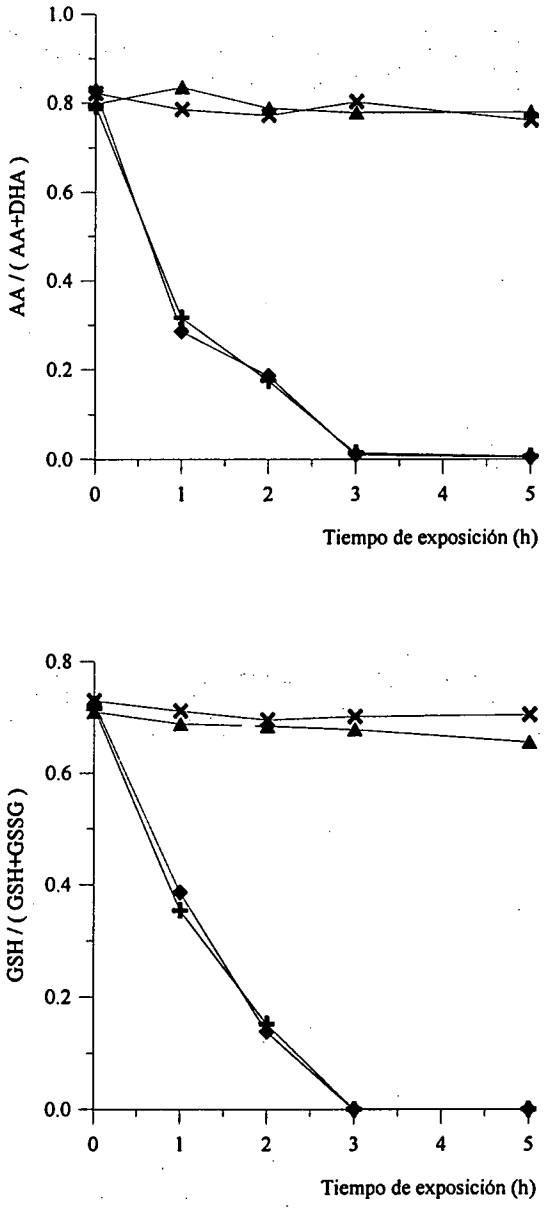


Figura V.4. Influencia del tiempo de exposición a ozono sobre los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG) en hojas de tomate. Resultados obtenidos en las cubetas de control (×, ▲) y de fumigación (+, ◆) del LFS.

En el líquen *Xanthoria parietina* se ha demostrado que la concentración de GSH aumenta en respuesta al aumento de contaminación atmosférica [80], y la misma tendencia se ha observado en otras plantas expuestas a ozono [34, 81]. En nuestro caso, los distintos resultados obtenidos pueden ser explicados por las elevadas concentraciones de ozono empleadas en nuestro LFS.

Por otra parte, los resultados obtenidos en los experimentos con plantas de patata en las OTCs, en los que se emplearon concentraciones de ozono mucho menores, y con tiempos de exposición mucho más largos, mostraron una respuesta diferencial para los dos sistemas redox. La relación AA/(AA+DHA) en plantas de patata expuestas a aire CF (concentración media de ozono, 10 $\mu g\ m^{-3}$) fue mucho menor que el correspondiente cociente GSH/(GSH+GSSG). Este resultado concuerda con los resultados de Luwe y col. [34]. Las plantas de patata expuestas a aire NF mostraron valores mucho más bajos para ambos indicadores; desafortunadamente, en estas muestras, la respuesta diferencial de los sistemas redox no pudo evaluarse debido a que la concentración de GSH estuvo por debajo del límite de cuantificación.

La evaluación simultánea de ambos indicadores redox, AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG), en un mismo extracto vegetal, puede considerarse útil por dos razones: en primer lugar, para confirmar los resultados en la evaluación del estrés oxidativo en una muestra dada, y en segundo lugar, porque el procedimiento propuesto constituye una herramienta fiable para investigar la respuesta diferencial de los dos sistemas redox a la acción de los agentes de estrés oxidativo. Las varianzas asociadas a un cambio de procedimiento, o a una inyección diferente, son eliminadas al emplear una única inyección y un único desarrollo electroforético para determinar ambos sistemas redox. Por lo tanto, el procedimiento descrito parece más apropiado para el estudio de la respuesta diferencial de los dos sistemas redox que otros procedimientos basados en determinaciones separadas de los mismos. La desventaja principal del procedimiento es un límite de cuantificación de GSH excesivamente alto, sin embargo, este límite se puede mejorar mediante el empleo de capilares de mayor paso óptico.

V.4. Referencias

1. A. Meister y M.E. Anderson, Ann. Rev. Biochem., 52 (1983) 711.
2. M.J. Penninckx y M.T. Elskens, Adv. Microb. Physiol., 34 (1993) 239.
3. H. Padh, Nutr. Rev., 46 (1991) 65.
4. C. Foyer, Antioxidants in Higher Plants, eds. R.G. Alscher y J.L. Hess, CRC Press, Boca Raton, FL, 1993, págs. 31-58.
5. U. Heber, C. Miyake, J. Mano, C. Ohno y K. Asada, Plant Cell Physiol., 37 (1996) 1066.
6. L.W. Mapson, The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol. 1, ed. A.C. Hulme, Academic Press, Londres, 1970, págs. 369-384.
7. G.M. Jaffe, Handbook of Vitamins, ed. J.L. Machlin, Marcel Dekker, Nueva York, 1984, págs. 199-244.
8. P.L. Conklin, E.H. Williams y R.L. Last, Proc. Natl. Acad. Sci., 93 (1996) 9970.
9. O. Arrigoni, J. Bioenerg. Biomemb., 26 (1994) 407.
10. C. Neubauer y H. Yamamoto, Photosynth. Res., 39 (1994) 137.
11. G. Forti y A.M. Eherenheim, Biochim. Biophys. Acta, 1183 (1993) 408.
12. P. Navas, J.M. Villalba y F. Cordoba, Biochim. Biophys. Acta, 1197 (1994) 1.
13. J.W. Anderson, C.H. Foyer y D.A. Waiker, Planta, 158 (1983) 442.
14. A.A.F. Rautenkranz, L. Li, F. Machier, E. Martinoia y J.J. Oertli, Plant Physiol., 106 (1994) 187.
15. H. Rennenberg, Aminoacids and their derivatives in higher plants, ed. R.M. Wallsgrove, Cambridge University Press, UK, 1995, págs. 155-171.
16. M. Baier y K.J. Dietz, The Plant Journal., 12 (1997) 179.
17. T. Russo, N. Zambrano, F. Esposito, R. Ammendola, F. Cimino, M. Fiscella, J. Jackman, M. O'Connor, C.W. Anderson y E. Apella, J. Biol. Chem., 270 (1995) 29386.

18. C.M. Grant, F.H. MacIver y I.W. Dawes, Curr. Genet., 29 (1996) 511.
19. C.H. Foyer y B. Halliwell, Planta, 133 (1976) 21.
20. B. Halliwell y C.H. Foyer, Planta, 139 (1978) 9.
21. R.G. Alscher, Physiologia Plant., 77 (1989) 457.
22. M.R.H. Lowik, J. Schrijver y M. Wedel, Int. J. Vit. Nutr. Res., 61 (1991) 43.
23. J.M Kim, K. Huang y R.D. Schmid, Anal. Lett., 23 (1990) 2273.
24. A. Sano, T. Kuwayama y M. Furukawa, Anal. Sci., 11 (1995) 405.
25. A. Jain, A. Chaurasia y K.K. Verma, Talanta, 42 (1995) 779.
26. H.P. Huang, R.X. Cai, Y.M. Du y Y.E. Zeng, Anal. Chim. Acta, 309 (1995) 271.
27. T.R. Ruiz, C.M. Lozano y A. Sanz, Anal. Chim. Acta, 308 (1995) 299.
28. S.P. Arya y M. Mahajan, Anal. Sci., 11 (1995) 853.
29. O.H. Abdelmageed, P.Y. Khashaba, H.F. Askal, G.A. Saleh, y I.H. Refaat, Talanta, 42 (1995) 573.
30. M.U. Özgür y S. Sungur, Talanta, 42 (1995) 1631.
31. K.K Hadady y I. Fabian, Anal. Lett., 28 (1995) 1421.
32. M.J. Esteve, R. Farré y A. Frígola, Fresenius J. Anal. Chem., 351 (1995) 804.
33. X. Hu y Z. Leng, Anal. Lett., 28 (1995) 2263.
34. M.W.F. Luwe, U. Takahama y U. Heber, Plant Physiol., 101 (1993) 969.
35. R. Stevanato, L. Avigliano, A. Finazzi-Agro y A. Agro, Anal. Biochem., 149 (1985) 537.
36. T.Z. Liu, N. Chin, M.D. Kiser y W.N. Bigler, Clin. Chem., 28 (1982) 2225.
37. R.C. Rose y D. Nahrwold, Anal. Biochem., 123 (1982) 389.
38. L.L. Lloyd, F.P. Warner, J.F. Kennedy y C.A. White, J. Chromatogr., 437 (1988) 447.
39. L.L. Lloyd, F.P. Warner, J.F. Kennedy y C.A. White, Food Chem., 28 (1988) 257.
40. M.C. Gennaro y C. Abrigo, Fresenius J. Anal. Chem., 340 (1991) 422.
41. S. Zapata y J.R. Dufour, J. Food Sci., 57 (1992) 506.

42. X. Chen y M. Sato, Anal. Sci., 11 (1995) 749.
43. H.J. Kim y Y.K. Kim, J. Food Sci., 53 (1988) 1525.
44. H.P. Wagner y M.J. McGarrity, J. Chromatogr., 546 (1991) 119.
45. W.D. Graham y D. Annette, J. Chromatogr., 594 (1992) 187.
46. T. Ito, H. Murata, Y. Yasui, M. Matsui, T. Sakai y K. Yamauchi, J. Chromatogr. B, 667 (1995) 355.
47. Y. Miura, T. Maruyama y T. Koh, Anal. Sci., 11 (1995) 617.
48. H.G. Daood, P.A. Biacs, M.A. Dakar y F. Hajdu, J. Chromatogr. Sci., 32 (1994) 481.
49. R. Leubolt y H. Klein, J. Chromatogr. A, 640 (1993) 271.
50. A. Baldesten, S.G. Hjalmarsson y G. Neumann, Fresenius Z. Anal. Chem., 290 (1978) 148.
51. T. Tsuda y H. Fukuba, J. Micronutr. Anal., 4 (1988) 217.
52. S. Fujiwara, S. Iwase y S. Honda, J. Chromatogr., 477 (1988) 133.
53. P.A. Marshall, V.C. Trenerry y C.O. Thompson, J. Chromatogr. Sci., 33 (1995) 426.
54. C.O. Thompson y V.C. Trenerry, Food Chem., 53 (1995) 43.
55. B.L. Ling, W.R.G. Baeyens, P.V. Acker y C. Dewaele, J. Pharm. Biomed. Anal., 10 (1992) 717.
56. E.V. Koh, M.G. Bissell y R.K. Ito, J. Chromatogr. A, 633 (1993) 245.
57. M. Chiari, M. Nesi, G. Carrea y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 645 (1993) 197.
58. U. Jegle, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 495.
59. J. Schiewe, Y. Mrestani y R. Neubert, J. Chromatogr. A, 717 (1995) 255.
60. M.W. Davey, G. Bauw y M. Van Montagu, Anal. Biochem., 239 (1996) 8.
61. K. Fukushi, S. Takeda, S.I. Wakida, M. Yamane, K. Higashi y K Hiiro, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 313.
62. O.K Choi y J.S. Jo, J. Chromatogr. A, 781 (1997) 435.

63. M.W. Davey, G. Bauw y M. Van Montagu, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 269.
64. C.H. Wu, Y.S. Lo, Y.H. Lee y T.I. Lin, J. Chromatogr. A, 716 (1995) 291.
65. A. Prochazkova, L. Krivankova y P. Bocek, Electrophoresis, 19 (1998) 300.
66. S. Honda, Y. Naitoh-Ohta, K. Togashi y A. Taga, Anal. Sci., 13 (1997) 557.
67. K.S. Wong y E.S. Yeung, Mikrochim. Acta, 120 (1995) 321.
68. B.L. Hogan y E.S. Yeung, Anal. Chem., 64 (1992) 2841.
69. V. Cavrini, R. Gotti, V. Andrisano y R. Gatti, Chromatographia, 42 (1996) 515.
70. O. Orwar, H.A. Fishman, N.E. Ziv, R.H. Scheller y R.N. Zare, Anal. Chem., 67 (1995) 4261.
71. G. Piccoli, M. Fiorani, B. Biagiarelli, F. Palma, L. Potenza, A. Amicucci y V. Stocchi, J. Chromatogr. A, 676 (1994) 239.
72. J. Zhou, T.J. O'Shea y S.M. Lunte, J. Chromatogr. A, 680 (1994) 271.
73. S.M. Lunte. y T.J. O'Shea, Electrophoresis, 15 (1994) 79.
74. T.J. O'Shea y S.M. Lunte, Anal. Chem., 65 (1993) 247.
75. E. Sofic, P. Riederer, R. Burger, W. Gsell y G. Heuschneider, Fresenius J. Anal. Chem., 339 (1991) 258.
76. J.M. Herrero-Martínez, E. Simó-Alfonso, V.I. Deltoro, A. Calatayud y G. Ramis-Ramos, Anal. Biochem., 265 (1998) 275.
77. M.T. Galcerán, L. Puignou y M. Diez, J. Chromatogr. A, 732 (1996) 167.
78. D.L. Massart, B.G.M. Vandegiste, L.C.M. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi y J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997, págs. 431-432.
79. B.A. Logan, D.H. Barker, B. Demmig-Adams y W.W. Adams, III, Plant, Cell Environ., 19 (1996) 1083.
80. L. Silberstein, B.Z. Siegel, S.M. Siegel, A. Mukhtar y M. Galun, Lichenologist, 28 (1996) 367.
81. A. Ranieri, G. D'Urso, C. Nali, G. Lorenzini y G.F. Soldatini, Physiol. Plant., 97 (1996) 381.

PARTE B

DETECCIÓN Y CONTROL DE LA ADULTERACIÓN DE QUESOS NO BOVINOS CON LECHE DE VACA

VI. CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE Y EL QUESO

CAPÍTULO VI

CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE Y EL QUESO

VI.1. Definición legal de la leche

La leche y los productos lácteos son, desde siempre, una fuente básica de alimentación en la dieta humana, existiendo en la mayoría de países leyes específicas que los protegen y regulan. La leche natural destinada a la alimentación humana, según se recoge en el Código Alimentario Español [1], se define como: "el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, del ordeño ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas, sanas y bien alimentadas". A continuación se realiza la siguiente matización "con la denominación genérica de leche se comprende única y exclusivamente, la leche natural de vaca". La leche producida por otros animales domésticos se designará indicando el nombre de la especie correspondiente (leche de oveja, de cabra, etc.).

VI.2. Propiedades físicas y físico-químicas de la leche

La leche es un líquido opaco, blanco mate, más o menos amarillento según el contenido de β-carotenos de la materia grasa, con sabor dulce y olor agradable.

En la Tabla VI.1 se detallan algunos valores esenciales de las constantes más utilizadas para determinar la calidad de la leche, y que indican su grado de frescura o posibles adulteraciones.

Tabla VI.1. Constantes físico-químicas de la leche [2]

Propiedad	Leche
Densidad	1.028 a 1.036 g/ml
Punto crioscópico	-0.51 a -0.55 °C
pH (a 20 °C)	6.5 a 6.7
Acidez valorable	0.15 a 0.18 g de ácido láctico/100 ml de leche

La *densidad* está relacionada con la riqueza en materia seca y en grasa, siendo estos contenidos antagónicos. Así, una leche pobre o aguada tiende a disminuir su densidad al reducirse la materia seca, pero a su vez tiende a incrementarla por disminuir el contenido en materia grasa (cuya densidad es del orden de 0.93 a 20°C). Por eso las leches enriquecidas en materia grasa tienen una densidad más baja, mientras que las leches descremadas la tienen más elevada.

El *punto crioscópico o temperatura de congelación* es variable, dentro de unos límites, en función de las condiciones zootécnicas. Su medida permite apreciar la cantidad de agua eventualmente añadida a la leche.

El *pH* da una información precisa del estado de frescura de la leche. Una leche fresca es neutra o muy ligeramente ácida, pero cuando las bacterias lácticas empiezan a actuar, una parte de la lactosa se degrada a ácido láctico (log K=3.86) lo que hace disminuir el pH.

La *acidez valorable* es el contenido aparente en ácidos, expresado en gramos de ácido láctico por 100 ml de leche.

VI.3. Composición química

La leche está compuesta por una matriz acuosa (contiene entre el 63 y el 87% de agua, según las especies) que actúa como medio dispersante de una mezcla compleja de constituyentes en distinto estado de agregación, pudiendo citarse los siguientes:

- Sustancias en disolución verdadera, como carbohidratos, sales minerales, vitaminas hidrosolubles y compuestos nitrogenados.
- Sustancias en dispersión coloidal, tales como micelas de fosfocaseinato cálcico, citratos y fosfatos cálcicos y magnésicos, seroproteínas, etc.
- Sustancias emulsionadas, como lípidos, esteroles y vitaminas liposolubles.

La estabilidad de la emulsión, que aparece como glóbulos grasos en el plasma acuoso, se debe a la presencia de una membrana envolvente lípido-proteica, cargada negativamente, que asegura la repulsión electrostática entre los distintos glóbulos. En el centro se hallan los lípidos de bajo punto de fusión, líquidos a temperatura ambiente, y en la periferia se encuentran glicéridos neutros, fosfolípidos y proteínas, constituyendo la membrana globular.

La composición de la leche varía de forma notable entre las distintas especies animales. En la Tabla VI.2 se comparan las composiciones porcentuales medias de la leche humana con las de vaca, cabra y oveja.

Tabla VI.2. Composición media de la leche de algunas especies [3].

Leche	Lactosa	Grasa	Proteínas	Caseína	Sólidos[a]	Cenizas[b]
Humana	6.6	3.3	1.4	0.85	12-13	0.23
Vaca	4.6-4.7	3.4-3.6	3.4-3.6	2.5	11-13	0.7-0.8
Cabra	4.3-4.7	4.3-4.4	4.0-4.2	3.0	11-17	0.8
Oveja	4.5-5.0	5.0-7.0	5.6-6.0	4.5	18-21	0.9-1.0

[a] Por sólidos se entiende el residuo seco tras calentar a 105 °C durante 2½ horas (incluye la grasa).
[b] Por cenizas se entiende el producto resultante de la incineración del residuo seco.

VI.3.1. Glúcidos

El principal azúcar de la leche es la lactosa, un disacárido formado por una α ó β-glucosa unida a una β-galactosa. Se encuentra disuelta y actúa como el principal componente osmótico de la leche, lo que permite el transporte de agua desde la sangre. Las transformaciones que puede experimentar la lactosa tienen un gran interés nutricional e industrial, ya que la elaboración de muchos productos lácteos se basa en estas transformaciones:

- Utilización metabólica: La lactosa es un nutriente para los mamíferos. Se metaboliza mediante rotura de la unión β 1-4 del disacárido por hidrólisis enzimática, transformándose en glucosa y galactosa.
- Fermentación láctica: Llevada a cabo por microorganismos en un proceso que tiene al ácido láctico como producto final.
- Otras fermentaciones: En la elaboración de productos lácteos pueden tener lugar otras fermentaciones, como la propiónica en la que se desprende anhídrido carbónico, o la butírica que estropea los quesos. Las fermentaciones se deben a diversos microorganismos sobre la lactosa o sus derivados.

VI.3.2. Materia grasa

La materia grasa de la leche se indica frecuentemente por la tasa butírica (conjunto de sustancias lipídicas que, por hidrólisis de los ésteres, dan lugar ácidos grasos), y varía en función de las condiciones zootécnicas, hasta el punto de que la proporción de sus ácidos grasos constituyentes es característica de las diversas especies animales, con incidencia en el sabor de productos derivados, como queso. Así, el contenido en ácidos caprílico y cáprico es más alto en las leches de oveja y cabra que en las de vaca. La materia grasa está constituida por un 98.5% de diversos

triglicéridos, 1% de fosfolípidos polares y 0.5% de sustancias liposolubles (colesterol, ácidos grasos libres, hidrocarburos y vitaminas A, D, E y K).

VI.3.3. Proteínas

Las proteínas de la leche se presentan en dos fases diferenciadas:

- *Fase micelar o dispersa*, inestable, constituida por las caseínas (partículas sólidas, en suspensión) que dispersan la luz y dan a la leche su aspecto blanco, opaco.

- *Fase soluble o continua*, estable, constituida por las proteínas solubles que permanecen en el suero.

En 1877 Hammarster distinguió tres proteínas en la leche: caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina. Para ello, floculó la caseína con ácido acético, dejando en disolución las proteínas del suero o seroproteínas, menos abundantes que la fracción caseínica, y que a su vez se pueden fraccionar en lactoalbúmina y lactoglobulina. En 1936 Pedersen demostró por ultracentrifugación la heterogeneidad de la caseína, y en 1939 Mellander separó por electroforesis 3 fracciones de caseína (α, β y γ) que se diferencian en uno o más aminoácidos. Posteriormente se obtuvo la γ-caseína como producto de degradación de la forma β. En la Tabla VI.3 se recopilan las principales proteínas de la leche de vaca: la fracción caseínica, más importante, y la fracción sérica.

a) Caseínas

Las micelas de caseína son proteínas desnaturalizadas cuyas cadenas, flojas y enmarañadas, están unidas químicamente a fosfato cálcico coloidal (fosfoproteína, con un 4% de grupo prostético) y se mantienen en suspensión por la presencia de cargas negativas y de grupos glucídicos hidrófilos. El tamaño micelar varía entre 30 y 300 nm, encontrándose la micela fuertemente hidratada.

Tabla VI.3. Algunas características de las proteínas de la leche de vaca [4].

Fracción	Variantes genéticas	Proteína (%)	pI	PM[b] ($\times 10^{-3}$)
Caseínas		75-85	-	-
α_{s1}-CN	A, B, C, D, E	39-46	4.92-5.35	23.6
α_{s2}-CN	A, B, C, D	8-11	-	25.2
κ-CN	A, B, C, E	8-15	5.37	19
β-CN	A^1, A^2, A^3, B, C, D, E	25-35	5.20-5.85	24
γ-CN		3-7	5.8-6.0	12-21
γ_1-CN	A^1, A^2, A^3, B	-	-	20.5
γ_2-CN	A^1/A^2, A^3, B	-	-	11.8
γ_3-CN	$A^1/A^2/A^3$, B	-	-	11.6
Proteínas del suero		15-22	-	-
β-LG	A, B, C, D, E, F, G	7-12	5.35-5.41	18.3
α-LA	A, B	2-5	4.2-4.5[d]	14.2
Seroalbúminas	-	0.7-1.3	5.13	66.3
Inmunoglobulinas	-	1.9-3.3	-	-
IgG1	-	1.2-3.3	5.5-6.8	162
IgG2	-	0.2-0.7	7.5-8.3	152
IgA	-	0.2-0.7	-	400[c]
IgM	-	0.1-0.7	-	950[d]
FSC[a]	-	0.2-0.3	-	80
Proteasas-Peptonas	-	2-6	3.3-3.7	4-41

[a] Componente secretor libre.

[b] Monómero, salvo cuando se indique otra cosa.

[c] Dímero.

[d] Pentámero.

Las caseínas representan aproximadamente el 80% del nitrógeno total de la leche de vaca, y dentro de ellas se distinguen 4 proteínas principales: α_{S1}-, α_{S2}-, β- y κ-caseínas (CN), en una relación aproximada de 40:10:35:12. Estas cadenas polipeptídicas presentan heterogeneidad con relación al grado de fosforilación (como sucede con las α_{S1}- y α_{S2}-CN) o glicosilación (como en el caso de la κ-CN) y/o sustituciones de aminoácidos controladas genéticamente [5].

Tanto la α_S-CN como la β-CN se unen fuertemente al calcio y precipitan a concentraciones de Ca^{2+} superiores a 6 mM. Sin embargo, la κ-CN, con solo un resto de fosfato, es soluble a elevadas concentraciones de Ca^{2+}, impidiendo la precipitación de las otras fracciones de la caseína (α y β) mediante la formación de complejos.

Por acción del cuajo, la κ-CN es proteolizada entre los aminoácidos 105 (Phe) y 106 (Met), lo que ocasiona la coagulación de la leche, fraccionándose ésta en la para-k-CN, que precipita en presencia de Ca^{2+} con el resto de fracciones de caseína, y un glicopéptido (caseinmacropéptido) que queda en disolución. Esta última propiedad juega un papel fundamental en la fabricación de quesos.

Finalmente, las γ-caseínas son el resultado de la proteolisis de las β-caseínas por una proteasa alcalina (plasmina) de la leche.

b) Proteínas del suero

El término proteínas del suero se emplea para designar aquellas proteínas solubles a pH 4.6 y a 20ºC, que se caracterizan por ser proteínas globulares sujetas a la desnaturalización por el calor. Sin embargo, dentro de esta denominación se incluyen las proteosas-peptonas, que no precipitan por calentamiento, y que se originan como fragmentos N-terminales provenientes de la proteolisis de la β-CN. La fracción de seroproteínas que precipitan por el calor está formada por β-lactoglobulinas (β-LGs), α-lactoalbúminas (α-LAs), inmunoglobulinas (Ig), seroalbúmina (BSA, *bovine serum albumin*) y otras proteínas en proporciones menores. Éstas proteínas no están sometidas a las modificaciones post-translacionales

que sufren las caseínas (glicosilación y fosforilación), aunque se conocen variantes genéticas de la α-LA y β-LG [6].

La β-LG es la proteína más abundante del suero, representando aproximadamente un 50 % de todas las seroproteínas. Está constituida por una cadena peptídica de 162 aminoácidos, diferenciándose de las β-LG caprina y ovina en 6 residuos. De forma mayoritaria existen 3 variedades genéticas en la leche de oveja (A, B, C), 2 en la de vaca (A, B) y una en la leche de cabra.

La α-LA tiene como función primordial intervenir en la síntesis de la lactosa. Está compuesta por 123 aminoácidos, diferenciándose de las α-LA caprina y ovina por la presencia de metionina en la posición 90. Al margen de esta diferencia, las α-LAs caprina y bovina se diferencian en once puntos de la cadena polipeptídica. Mayoritariamente existen dos variedades genéticas de α-LA en la leche de oveja (A, B) y sólo una en las de vaca y cabra.

Las inmunoglobulinas del suero de la leche son semejantes a las de la sangre, y son importantes por su actividad como anticuerpos.

Hay otras proteínas minoritarias en la leche como la seroalbúmina, serotransferrina y lactoferrina, de gran importancia para el aporte de hierro.

En la Tabla VI.4 se muestra la distribución porcentual de las proteínas en leches de vaca, cabra y oveja.

Tabla VI.4. Composición media de las fracciones nitrogenadas y proteicas de las leches de vaca, cabra y oveja [7].

Fracción	Vaca	Cabra	Oveja
Nitrógeno no proteico	0.047	0.041	0.041
Proteínas del suero, total	0.56	0.63	0.96
α-LA	0.1	0.12	0.19
β-LG	0.3	0.23	0.38
Caseínas, total	2.73	2.86	4.49
α-CN	1.27	0.73	1.79
β-CN	1.01	1.60	2.12
κ-CN	0.40	0.23	0.46

VI.3.4. Otros constituyentes

La leche de vaca contiene alrededor del 1% de sales, derivadas tanto de aniones orgánicos como inorgánicos, siendo el contenido en cenizas del orden del 0.7%. Como anión orgánico más abundante se encuentra el citrato.

Entre los elementos más frecuentes están: Na, K, Ca, Mg, P, Cl y S, destacando entre ellos el Ca y el P, tanto por su valor nutricional como por su papel relevante en la estabilización de las caseínas. La leche contiene también trazas de otros muchos elementos, como molibdeno y hierro, que forman parte de los enzimas.

Están también presentes, aunque en cantidades muy pequeñas pero de gran importancia cualitativa, un gran número de sustancias, conocidas como biocatalizadores, entre las que se destacan las vitaminas y los enzimas, y a las que deben añadirse otros elementos biológicos como las bacterias y restos de células y

células enteras procedentes de la descamación y de la filtración de la sangre (leucocitos).

Por último, la leche contiene también gases disueltos, esencialmente dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno.

VI.4. Queso

VI.4.1. Definición de queso

Según la reglamentación técnico-sanitaria de la leche y de los productos lácteos, el queso es el producto obtenido por coagulación enzimática de la leche y/o determinados productos lácteos, con previa o posterior separación de al menos parte del agua, lactosa y sales minerales, seguido o no de maduración [8]. Los ingredientes básicos, además de la leche o productos lácteos citados, que se utilizan en la elaboración del queso son:

- Cultivos de levaduras y bacterias lácticas
- Cuajo, ácidos o enzimas coagulantes
- Sal
- Aditivos autorizados según tipos de quesos y según la legislación de cada país.

VI.4.2. Elaboración del queso

La elaboración de los quesos se ha hecho durante siglos de forma artesanal, pero en la actualidad, la mayoría se elabora en industrias con tecnologías modernas, en condiciones higiénicas más adecuadas. A continuación se describen brevemente las etapas de la elaboración:

Recepción de la leche: La leche ordeñada en las granjas se encuentra a una temperatura de 37°C, resultando un excelente medio para el cultivo de todo tipo de bacterias, por lo que debe ser inmediatamente enfriada a una temperatura de 2-6°C. Cuando la leche es descargada de la cisterna que la ha transportado hasta la central quesera, se pasa por un tamiz, consiguiendo así la eliminación de las impurezas más groseras.

Tratamiento previo: El tratamiento previo es distinto según el tipo de queso, pero en general se pasa la leche por una centrífuga de alta velocidad, con el objeto de eliminar impurezas, bacterias y esporas.

Seguidamente se procede a la pasteurización a 72-75°C durante 15-20 s, asegurando la eliminación de bacterias patógenas. Por último, se añade un cultivo de bacterias lácticas, que producen ácido láctico reduciendo el pH y ayudando a la coagulación de la leche.

Coagulación de la leche: En esta etapa se añade cuajo a la leche, el cual, por su actividad enzimática, a temperaturas del orden de 28-33°C, produce su coagulación en un tiempo variable que depende del tipo de queso. La leche coagulada es cortada en granos cuyo tamaño depende del tipo de queso, con posterior agitación y calentamiento, para eliminar la mayor cantidad de suero.

Moldeado, prensado y salado: Después de la eliminación del suero, los granos se colocan en moldes y se prensan. Una vez el queso está moldeado y prensado se procede al salado, mediante inmersión en baños de salmuera o por adición de sal sobre la corteza. Con el salado se obtiene una mejor conservación del queso, y además se realza su aroma.

Maduración y envasado: La maduración del queso es un proceso bioquímico muy complejo, en el que tienen lugar una serie de reacciones catalizadas por enzimas microbianas, dependientes de factores externos e internos. En todos los tipos de quesos tiene lugar la fermentación láctica, en la que el ácido láctico favorece la acción del cuajo, facilitando la separación del suero, a la vez que previene el desarrollo de

bacterias indeseables y regula los procesos proteolíticos en virtud de su influencia sobre las actividades enzimáticas [9]. La degradación de proteínas, es la etapa más importante de la maduración para muchos tipos de quesos, ya que afecta a su sabor y textura. La extensión y naturaleza de la degradación de proteínas depende de los siguientes factores:

- Tipo y concentración de enzimas microbianas.
- Contenido en agua.
- Presencia de ácido láctico.
- Temperatura.
- pH.
- Sales que afectan a la actividad enzimática.

Cada queso tiene sus propias condiciones de humedad, aireación y temperatura para una óptima maduración. Por último, los quesos son envasados y empaquetados antes de su salida hacia los puntos de distribución y venta.

VI.4.3. Clasificación

Es difícil clasificar los quesos de una forma clara debido a la amplia variedad existente, ya que muchos de ellos se encuentran en los límites de las clases. Algunos de los criterios que se pueden seguir para su clasificación son:

- Tipo de leche.
- Tipo de coagulación de la leche.
- Contenido en humedad.
- Contenido en grasa.
- Textura.
- Tipo de microorganismos empleados en su elaboración.
- País y/o región de origen.

VI.5. Adulteraciones

Los productos derivados de la producción lechera y de su industria deben protegerse frente a eventuales fraudes, que pueden manifestarse de diferentes modos, bien como fraudes en la leche en el momento de su producción, o como fraudes inferidos en los derivados a lo largo de su fabricación.

En consumo directo, las adulteraciones más comunes de la leche son la adición de agua y/o el desnatado. Para su detección, generalmente se recurre a determinaciones de densidad y porcentaje de grasa y, si conviene, a la medida del punto crioscópico. Estos parámetros, en función de la adulteración, varían como sigue:

i) La adición de agua rebaja los valores de la densidad y el porcentaje de grasa, elevando el punto crioscópico.

ii) La adición de leche desnatada eleva la densidad y rebaja el porcentaje de grasa, mientras que el punto crioscópico prácticamente no se altera.

iii) La adición de agua y desnatado, simultáneos, rebaja el porcentaje de grasa y eleva el punto crioscópico, mientras que prácticamente no se altera la densidad.

Cuando la leche es empleada en la fabricación de productos lácteos, especialmente en quesos de oveja y cabra, se suele producir también adulteración por adición de leche de vaca. El elevado precio de la leche de oveja, y en menor medida, la de cabra, unidos a la superproducción de leche de vaca, lleva a adulterar aquellas, con el fin de aprovechar la producción de leche de vaca sin pérdida de beneficios. Existen métodos, basados especialmente en la determinación de proteínas lácteas [10], que permiten constatar y evaluar esta adulteración.

VI.6. Técnicas del análisis de proteínas de leche, queso y productos lácteos

Con el fin de estudiar tanto el polimorfismo existente en las proteínas de la leche, los procesos de maduración y la evaluación de adulteraciones en ésta y en sus derivados, se han desarrollado numerosos métodos [11-13], habiéndose utilizado principalmente técnicas inmunológicas, cromatográficas y electroforéticas.

VI.6.1. Técnicas de inmunoensayo

Se ha estudiado la capacidad antigénica de caseínas, β-LGs e inmunoglobulinas [14-18], obteniéndose los mejores resultados con estas últimas [15]. Por lo general, los métodos inmunológicos son sensibles y de fácil ejecución, siendo su principal inconveniente la obtención del anticuerpo específico, así como la posibilidad de dar reacciones cruzadas que puedan dificultar la interpretación de los resultados. Sin embargo, en quesos el proceso proteolítico no afecta al resultado, pudiendo aplicarse a productos con elevado grado de maduración [14-16].

Recientemente, Beer y col. [17] desarrollaron una técnica indirecta competitiva mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) usando la β-LG bovina para detectar leche de vaca en quesos de oveja y cabra, mientras que Richter y col. [18] han empleado la γ-CN bovina en la determinación de leche de vaca en leches de cabra y oveja y en quesos.

VI.6.2. Técnicas cromatográficas

VI.6.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

a) Cromatografía de intercambio aniónico

La separación de las caseínas se basa principalmente en el uso de columnas de dietilaminoetil-celulosa, empleando como eluyente un tampón de pH 7-8.5 [19-21] y un gradiente de NaCl. La separación de las α_{s1}- y α_{s2}-CN se consigue utilizando concentraciones elevadas de urea (3-8 M), y gradientes adecuados de NaCl.

Haasnoot y col. [22], empleando este tipo de cromatografía, demostraron que la adulteración de la leche de vaca se puede detectar a nivel del 1-2% en leche de cabra, del 2-4% en leche de oveja y del 10% en queso, usando como marcador un péptido derivado de la acción del cuajo sobre la α_{s1}-CN bovina.

Respecto a proteínas del suero, Humphey y col. [20] investigaron diversos tampones entre pH 6 y 8.5, encontrando que a pH 6 y con un gradiente de NaCl se pueden separar la α-LA y las β-LGs A y B. Laezza y col. [23], empleando un gradiente de NaCl a pH 7, consiguieron separar e identificar proteínas séricas bovinas y ovinas.

También se ha descrito la utilización de un gradiente de acetato sódico para conseguir la separación de α-LA, β-LG A y B, y BSA en leche desnatada [24, 25].

b) Cromatografía de intercambio catiónico

La separación de las caseínas se puede llevar a cabo utilizando una columna de intercambio catiónico, empleando en la separación un tampón de pH 3.5 que contiene urea 8 M y 2-mercaptoetanol, y en el que se ha establecido un gradiente de NaCl [21]. Hollar y col. [26] han podido separar las diferentes variantes genéticas de la β-CN.

La cromatografía líquida de intercambio catiónico se ha utilizado para la separación y aislamiento de proteínas de suero u otras proteínas minoritarias. Así, por ejemplo, la lactoferrina y las lactoperoxidasas se separan de las restantes proteínas y péptidos por cromatografía sobre carboximetilcelulosa a pH 7.8 [27, 28]. La cromatografía líquida de intercambio catiónico también se ha empleado en la separación de glicomacropéptidos a valores de pH bajos [29].

VI.6.2.2. Cromatografía en fase inversa

Para la separación de caseínas por cromatografía en fase inversa se utilizan columnas de los tipos C_4, C_8 y C_{18}. Como fase móvil es habitual utilizar la mezcla ácido trifluoroacético-agua-acetonitrilo (0.1:70:30) con un gradiente de acetonitrilo hasta (0.1:50:50). Mediante una columna C_{18} [30], todas las caseínas son eluidas en un tiempo inferior a 30 min, siendo el orden de elución: κ-CN, α_{s2}-CN, α_{s1}-CN y β-CN, con la separación de diversas variantes genéticas de las mismas. El empleo de columnas con menor longitud de la cadena hidrocarbonada llevó a pérdidas en la resolución entre las diferentes variantes caseínicas [31, 32].

La cromatografía líquida en fase inversa se ha utilizado para la leche desnatada [32, 33] y para la evaluación e identificación de quesos. Pham y Nakai [34] utilizando una columna C_8 y elución isocrática con tampón fosfato 0.1 M a pH 6, pudieron determinar el tiempo de maduración de diversos quesos, con un 65.9 % de aciertos. Por otro lado, con una columna C_8, y usando un gradiente ternario agua-acetonitrilo-metanol (96.8:1.2:2 a 56.3:30:13.4), y una concentración constante de ácido trifluoro acético del 0.1 %, se pudieron distinguir diferentes tipos de quesos, clasificándolos mediante técnicas de estadística multivariante con un grado de acierto del 90 % [35].

Mediante HPLC en fase inversa, también se han separado e identificado péptidos o aminoácidos que contribuyen al aroma y olor del queso, procedentes bien

de su maduración, o bien debidos al tipo de queso, al origen animal de la leche, o al tipo de cuajo usado en su elaboración [36-38].

Las proteínas séricas también se pueden separar y cuantificar mediante columnas de fase inversa [39-44]. Por ejemplo, se pudo separar α-LA, β-LG y BSA empleando una columna C_8 con gradiente de isopropanol [39]. Por otro lado, con un gradiente de acetonitrilo y una columna C_6 se consiguen separar las variantes genéticas de la β-LG A y B, y parcialmente la β-LG C, así como BSA y α-LA [40].

Se han establecido diversos métodos para detectar la presencia de leche de vaca en quesos de oveja y cabra [41-46]. De Frutos y col. [41, 42] han utilizado una columna C_4 de 5 cm de longitud y un gradiente de acetonitrilo, detectando la presencia del pico de la α-LA bovina en quesos conteniendo un 10% de leche de vaca.

Urbanke y col. [43] establecieron la presencia de 1-3% de leche de vaca en leches de cabra y oveja, y en quesos, con una columna C_5, empleando para ello 0.1% de ácido trifluoroacético y un gradiente de acetonitrilo. Recientemente, De Noni y col. [45, 46] han podido detectar hasta un 1% de leche de vaca en quesos de cabra [45] y oveja [46].

VI.6.2.3. Otras cromatografías

a) Cromatografía de exclusión

La cromatografía de exclusión se ha utilizado para separar las caseínas de otras proteínas lácteas de acuerdo con sus masas moleculares [47-50]. Este tipo de cromatografía se ha utilizado generalmente con una finalidad preparativa, ya que no se consiguen separar las proteínas dentro de los grupos.

b) Cromatografía hidrofóbica

La cromatografía hidrofóbica puede constituir un modo atractivo para aislar caseínas, sin embargo las pocas investigaciones a este respecto [51, 52] muestran resultados poco satisfactorios respecto a los obtenidos en cromatografía en fase inversa.

c) Cromatografía de afinidad

Este tipo de cromatografía se suele emplear para purificar proteínas minoritarias presentes en el suero, como la lactoferrina [53]. Para separar las caseínas, se hace uso de columnas de hidroxiapatito, eluyendo éstas en orden creciente a su número de unidades de fosfato [30].

VI.6.3. Técnicas electroforéticas

VI.6.3.1. Electroforesis en capa de gel

La electroforesis en capa de gel de poliacrilamida se ha utilizado intensivamente en el estudio de las proteínas lácteas [54], evolucionando desde separaciones basadas en la relación carga/masa (PAGE, *polyacrilamide gel electrophoresis*), hasta llegar a separaciones basadas en la masa molecular (SDS-PAGE) o en diferencias de punto isoeléctrico (IEF, *isoelectrofocusing*, enfoque isoeléctrico o isoelectroenfoque).

a) PAGE

Esta técnica ha sido utilizada por diversos investigadores para estudiar la degradación de las caseínas y caracterizar los productos de hidrólisis, siendo indicada para cuantificar la proteolisis de los quesos [55-60].

La adulteración de los quesos de oveja o de cabra con leche de vaca, o de leche de cabra en quesos de oveja, se cuantifica habitualmente por PAGE [61-70], empleándose como marcadores en algunos procedimientos la β-LG A y B de origen bovino [63-66], y en otros la α_{s1}-CN bovina [55, 56, 61, 68, 69]. Estas proteínas presentan una mayor movilidad electroforética respecto a sus homónimas de oveja y cabra. Molina y col. [63, 67], empleando el primer criterio, obtuvieron límites de detección del orden del 1% de leche de vaca en quesos de oveja y cabra.

Sin embargo, esta técnica es válida para quesos frescos y de bajo grado de maduración, pero en el caso de quesos maduros, en los cuales la degradación de las caseínas es patente, aparecen nuevas bandas en el espectro electroforético, dificultando su interpretación.

b) SDS-PAGE

Basch y col. [71] desarrollaron un método para cuantificar caseínas y proteínas del suero en leche líquida y en polvo. Meisel y Carstens [72] concluyeron que el SDS-PAGE es adecuado para determinar el contenido de proteínas del suero y caseína en productos lácteos. Aunque la separación de las proteínas tiene lugar en función de su masa molecular, se obtuvo un comportamiento anómalo (un retraso) de la α_{S1}-CN respecto a la β-CN, pese a ser la primera de menor peso molecular que la segunda. La explicación dada por Cremer y Richardson [73] es el gran tamaño hidrodinámico no esperado de la α_{s1}-CN.

Con SDS-PAGE y la ayuda de un densitómetro óptico se puede obtener información sobre el proceso de curación de un queso, ya que se puede observar una

disminución en la intensidad de las bandas de las caseínas, y un aumento en el número de bandas de péptidos de bajo peso molecular con el tiempo de maduración [74-78], lo que puede aportar datos adicionales a los estudios realizados vía PAGE. La medida de masas moleculares es una ventaja importante de la técnica SDS-PAGE respecto al PAGE [77, 79, 80].

c) IEF

La separación de las proteínas de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI) es especialmente útil en el análisis de caseínas y sus variantes genéticas [81-83].

Braun y col. [84] desarrollaron un método IEF para determinar el contenido de caseínas, proteínas séricas y proteínas totales en diversos alimentos empleando geles de poliacrilamida con urea, y utilizando la α_{S1}-CN B como marcador para las caseínas, y α-LA y β-LG A como marcadores para las proteínas séricas.

Varios autores han sometido la fracción caseínica de las proteínas a la técnica del IEF con el objeto de detectar adulteraciones [85-88]. Addeo y col. [87-90] han podido detectar un 0.5% de leche de vaca en quesos de leche de oveja, cabra o mezcla de ambas, a través de la generación *in vitro* de γ_2-CN mediante la adición de plasmina.

Para la detección de adulteraciones también se ha empleado la fracción sérica [66, 89-91]. Addeo y col. [90], empleando como marcador β-LG bovina, han podido detectar la presencia de un 0.5% de leche de vaca en quesos de oveja.

VI.3.2. Electroforesis capilar

Recientemente, se han desarrollado numerosos métodos de análisis de proteínas lácteas mediante CE (Tabla VI.5). El objeto de estos métodos es mejorar el control de calidad de la leche y sus derivados, incluyendo aspectos tales como los polimorfismos, la proteolisis y la detección y evaluación de adulteraciones.

Las principales proteínas lácteas (α_s-CN, β-CN, α-LA y β-LGs) se han separado en capilares de sílice fundida, empleando tampón fosfato de pH 7.0 conteniendo urea 4 M [92], o una alta concentración de tampón borato de pH 10 [93], con el fin de mantener las caseínas en disolución.

De Jong y col. [94] emplearon un capilar recubierto con polímero y un tampón fosfato de pH 2.5 conteniendo urea 6 M, para determinar simultáneamente proteínas séricas y caseínas, con discriminación de algunas variantes genéticas, en leches de vaca [94] y cabra [95]. Recio y col. [96] modificaron este método, minimizando la adsorción de proteínas, y lo aplicaron al análisis de variantes genéticas en leches de diferentes especies [97].

Respecto a las proteínas del suero, se han desarrollado diversos métodos para separar e identificar las principales (α-LA, β-LG A y B, BSA e IgG), empleando capilares de sílice con tampones de elevado pH en combinación con diferentes modificadores orgánicos [98, 99], aditivos poliméricos en el electrolito soporte [100], y elevada fuerza iónica en tampones de pH alcalino [101], estrategias todas ellas destinadas a reducir la adsorción de las proteínas a la pared del capilar.

Recientemente, Fairise y Cayot [102] han usado MEKC para separar las proteínas lácteas tras su desnaturalización con SDS y DL-ditiotreitol. La principal ventaja de este método es el corto tiempo de análisis (90 s) frente a los procedimientos por CZE (30 min) [103]. Por otra parte, este procedimiento es poco adecuado para detectar adulteraciones, debido a la ausencia de estudios cuantitativos, y a la irreproducibilidad en el tiempo de migración de la β-LG, fuertemente dependiente del proceso de preparación de la muestra.

La aplicación de la CE al estudio de la proteolisis de proteínas lácteas permite detectar cambios en la hidrólisis de la caseína, con la consiguiente observación de productos de degradación, siendo de especial interés los fenómenos de proteolisis producidos durante la maduración de quesos [104-111].

También, se han desarrollado métodos de CE [96, 100, 101, 106] para evaluar los cambios que experimentan la leche y sus derivados sometidos a calentamiento.

La CE también se ha utilizado para evaluar la adición fraudulenta de cuajo o suero sólido a productos lácteos (basada normalmente en la detección y cuantificación del caseinmacropéptido) [96, 112, 113], así como la adulteración de leche fresca con leche en polvo [92, 94, 114, 115].

La adulteración de productos lácteos de determinado origen animal con leche de otras especies, puede ser detectada en base a los diferentes perfiles electroforéticos proteicos [116-120]. Recientemente, Cartoni y col. [118-120] empleando capilares metil silanizados han detectado hasta un 2% de leche de vaca en leches de oveja y cabra, y la adición de hasta un 4% de la misma en quesos de oveja y cabra.

Tabla VI.5. Métodos de análisis de proteínas lácteas por CE.

Proteínas	Condiciones	Aplicaciones	Ref.
α-LA, β-LGA y B, α_S-CN, β-CN	Capilar de sílice, fosfato 0.5 M, pH 6-9 con/sin urea 4 M.	Adulteración de leche fresca con leche en polvo (β-CN/α-LA).	[92]
α-LA, β-LG, α_s-CN, β-CN	Capilar de sílice, borato 250 mM, pH 10.	Análisis cualitativo de proteínas de leche y huevo.	[93]
Fracción caseínica y productos de hidrólisis	Capilar de sílice, fosfato 0.1 M, urea 4 M, pH 7.3.	Monitorización de la hidrólisis de la caseína.	[104]
α- LA, β-LG A y B BSA y fracción caseínica	Capilar recubierto de polímero hidrofílico, fosfato 10 mM, pH 2.5, MHEC 0.05%, urea 6 M; citrato 10 mM, pH 2.45, 0.05% MHEC, urea 6 M.	Separación de proteínas y sus variantes genéticas de leche de vaca, cabra y oveja. Efecto del calor sobre las caseínas. Análisis cualitativo de leche de vaca, cabra, oveja y humana. Análisis de proteínas de soja.	[94] [116]
α-LA, β-LG A y B y fracción caseínica de la leche de oveja	Capilar recubierto de polímero hidrofílico, citrato 20 mM, pH 3.0, 0.05% MHEC, urea 6 M.	Análisis cualitativo de proteínas de la leche de oveja y sus variantes genéticas.	[95]

Tabla VI.5. (Continuación)

α-LA, β-LG, BSA y fracción caseínica	Capilar recubierto de polímero hidrofílico, citrato 20 mM, pH 3.0, 0.05% MHEC, urea 6 M.	Medida de los niveles de desnaturalización por efecto del calor de BSA, α-LA y β-LG en exceso de caseínas.	[96]
		Identificación de fracción caseínica y sus variantes genéticas en leche de cabra, oveja y vaca.	[97]
		Identificación de productos de la proteolisis de la caseína.	[107]
α-LA, β-LG A, B y C y BSA	Capilar de sílice, MES 50 mM, pH 8.0, 0.1% Tween 20.	Análisis cualitativo de las variantes de β-LG en leche de vaca.	[98]
α-LA, β-LG A y B, BSA y IgG	Capilar de sílice, borato 150 mM, pH 8.5, 0.05% Tween 20.	Análisis cualitativo de proteínas del suero.	[99]
α-LA, β-LG y BSA	Capilar recubierto de poliacrilamida, Tris 40 mM, borato 40 mM, 0.1% SDS, 10% (p/v) PEG 8000 (CGE).	Análisis cuantitativo de las principales proteínas del suero en leches entera y UHT. Comparación con HPLC.	[100]

Tabla VI.5. (Continuación)

α-LA, β-LG A y B y BSA	Capilar de sílice, borato 100 mM, pH 8.2, sulfato 30 mM.	Evaluación de la desnaturalización de las proteínas del suero en leches sometidas a tratamientos térmicos.	[101]
		Cuantificación de las proteínas del suero.	[106]
α-LA, β-LG A y B, BSA y IgG	Capilar de sílice, fosfato 70 mM, pH 2.5.	Análisis cuantitativo de suero. Identificación de caseinmacropéptido.	[112]
α-LA, β-LG, α_s-CN, β-CN	Capilar de sílice, borato 3 mM, pH 9.5, SDS 8.2 mM.	Análisis cualitativo de proteínas de leche.	[102]
α-LA, β-LG	Capilar metil silanizado, borato 80 mM, pH 9.2.	Adulteración de quesos de oveja y cabra.	[118-120]
α-LA, β-LG, α_s-CN, β-CN	Capilar recubierto de poliacrilamida, fosfato 50 mM, pH 2.5, urea 4 M, 0.1% Tween 20.	Adulteración de leche fresca con leche en polvo.	[114-115]

VI.7. Referencias

1. Código Alimentario Español. BOE 21/09/1967, Capítulo XV: leche y derivados.
2. F.M. Luquet, Leche y productos lácteos, Vol.1, Acribia, Zaragoza, 1991.
3. F. Albonico y G. Cerutti, Chimica i technologia del latte e dei suoi derivati, Etas Kompass, Milán, 1966.
4. H.D. Belitz y W. Grosch, Química de los alimentos. Leche y productos lácteos, Acribia, Zaragoza, 1985.
5. P.F. Fox y D.M. Mulvihill, J. Dairy Res., 49 (1982) 679.
6. F. Grosclaude, INRA Prod. Anim., 1 (1988) 5.
7. J.E. Storry, A.S. Grandison, D. Millar, A.J. Owen y G.D. Ford, J. Dairy Res., 50 (1983) 215.
8. R. Madrid, Nuevo Manual de Tecnología Quesera, ed. AMV y Mundi Prensa, Madrid, 1994.
9. E. Primo Yúfera, Química Agrícola, Vol III. Alimentos, ed. Alhambra, Madrid, 1987.
10. R. Grappin y B. Ribadeau-Dumas, Analytical methods for milk proteins, en Advanced dairy chemistry, Vol.1, Proteins, ed. P.F. Fox, Elsevier Applied Science, Londres, 1992, págs. 1-62.
11. M. Ramos y M. Juarez, Int. Dairy Fed. Bull., 202 (1986) 175.
12. E.D. Strange, E.L. Malin, D.L. Van Hekken y J.J. Basch, J. Chromatogr., 624 (1992) 81.
13. I. Recio, L. Amigo y R. López-Fandiño, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 231.
14. M. Ramos, Rev. Esp. de Lechería, 101 (1976) 147.
15. H. Bernhaver, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 177 (1983) 8.
16. J. Elbertzhageng y E. Wenzel, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 175 (1982) 15.

17. M. Beer, I. Krause, M. Stapf, C. Schwarzer y H. Klostermeyer, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 203 (1996) 21.
18. W. Richter, I. Krause, C. Graf, I. Sperrer, C. Schwarzer y H. Klostermeyer, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 204 (1997) 21.
19. P. Barrefors, B. Ekstrand, L.F. Fagerstam, M. Larsson-Raznikiewicz, J. Schaar y P. Steffner, Milchwissenschaft, 40 (1985) 257.
20. R.S. Humphrey y L.J. Newsome, New Zealand J. Dairy Sci. Technol., 19 (1984) 197.
21. A.T. Andrews, M.D. Taylor y A. J. Owen, J. Chromatogr., 348 (1985) 177.
22. W. Haasnoot, D.P. Venema y H.L. Elenbaas, Milchwissenschaft, 41 (1986) 642.
23. P. Laezza, G. Nota y F. Addeo, Milchwissenschaft, 46 (1991) 559.
24. B. Manji, A.R. Hill, Y. Kakuda y D.M. Irvine, J. Dairy Sci., 68 (1985) 3176.
25. A.R. Hill, B. Manji, Y. Kakuda, C. Myers y D.M. Irvine, Michwissenschaft, 42 (1987) 693.
26. C.M. Hollar, A.J.R. Law, D.G. Dalgleish y R.J. Brown, J. Dairy Sci., 74 (1991) 2403.
27. B. Ekstrand y L. Bjorck, J. Chromatogr., 358 (1986) 429.
28. S. Yoshida y Y. Xiuyun, J. Dairy Sci., 74 (1991) 1439.
29. J. Leonil y D. Molle, J. Dairy Res., 58 (1991) 321.
30. S. Visser, K. J. Slangen y H.S. Rollema, Milchwissenschaft, 41 (1986) 559.
31. E.D. Strange, D. Van Hekken y M.P. Thompson, J. Food Sci., 56 (1991) 1415.
32. N. Parris, A.E. White y H.M. Farrell, Jr., J. Agric. Food Chem., 38 (1990) 824.
33. S. Visser, C. J. Slangen y H.S. Rollema, J. Chromatogr., 548 (1991) 361.
34. A.M. Pham y S. Nakai, J. Dairy Sci., 67 (1984) 1390.
35. A. Mohler-Smith y S. Nakai, Can. Inst. Food Sci. Tecnol. J., 23 (1990) 53.

36. F.J. Garcia-Palmer, N. Serra, A. Palou y M. Gianotti, J. Dairy Sci., 80 (1997) 1908.
37. R. Grappin y E. Beuvier, Int. Dairy J., 7 (1997) 751.
38. H.K. Mayer, C. Rockenbauer y M. Mlcak, Lait, 78 (1998) 425.
39. L.L. Diosady, I. Bergen y V.R. Harwalkar, Milchwissenschaft, 35 (1980) 671.
40. R.J. Pearce, Aus. J. Dairy Technol., 38 (1983) 114.
41. M. de Frutos, A. Cifuentes, J.C. Diez-Masa, L. Amigo y M. Ramos, J. High Resolut. Chromatogr., 14 (1991) 289.
42. M. De Frutos, A. Cifuentes, L. Amigo, M. Ramos y J.C. Diez-Masa, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 195 (1992) 326.
43. W. Urbanke, W. Luf y E. Brandl, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 195 (1992) 137.
44. L. Pellegrino, I. De Noni, A. Tirelli y P. Resmini, Sci. Tec. Latt.-Cas., 42 (1991) 87.
45. I. De Noni, A. Tirelli y F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 47 (1996) 7.
46. L. Pellegrino, A. Tirelli y F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 43 (1992) 297.
47. M. Anderson, C. Moore y M.C.A. Griffin, J. Dairy Res., 53 (1986) 585.
48. G.P. McNeill y W.J. Donnelly, J. Dairy Res., 54 (1987) 19.
49. T. Aoki, Y. Kako y T. Imamura, J. Dairy Res., 53 (1986) 53.
50. T. Aoki, N. Yamada, I. Tomita, Y. Kako y T. Imamura, Biochim. Biophys. Acta, 91 (1987) 238.
51. L.C. Chaplin, J. Chromatogr., 363 (1986) 329.
52. T. Sanogo, D. Paquet, F.Aubert y G. Linden, J. Dairy Sci., 72 (1987) 2242.
53. T.W. Hutchens, J.S. Magnuson y T.T. Yip, Biochim. Biophys. Acta, 99 (1989) 232.
54. H.E. Swaisgood, Methods of Gel Electrophoresis of Milk Proteins, American Dairy Science Association, Washington DC, 1975.
55. M. Ramos, I. Martínez-Castro y M. Juárez, J. Dairy Sci., 60 (1977) 870.

56. M. Ramos, R.M. Sánchez y A. Olano, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 9 (1985) 24.

57. L. Chianese, R. Mauriello, L. Moio, N. Intorcia y F. Addeo, J. Dairy Res., 59 (1992) 39.

58. H.K. Mayer, Milchwissenschaft, 52 (1997) 443.

59. C.M. Mulvihill y P.F. Fox, J. Dairy Res., 46 (1979) 641.

60. R. Grappin, T.C. Rank y N.F. Olson, J. Dairy Sci., 68 (1985) 531.

61. K.F. Ng-Kwai-Hang y E.M. Kroeker, J. Dairy Sci., 67 (1984) 3052.

62. D.L. Van Hekken y M.P. Thompson, J. Dairy Sci., 75 (1992) 1204.

63. L. Amigo, M. Ramos, J. Martin-Alvarez y M. Barbosa, J. Dairy Sci., 74 (1991) 1482.

64. Determinación de leche de vaca en queso de oveja o de cabra y determinación de leche de cabra en queso de oveja, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Métodos oficiales de análisis, Vol. IV, Madrid 1994, págs. 112-122.

65. H. Brehmer y A. Klinger, Arch. Lebensmittel., 40 (1989) 34.

66. L. Amigo, I. Ibañez, C. Fernández, G. Santa-Maria y M. Ramos, Milchwissenschaft, 44 (1989) 215.

67. E. Molina, M. Ramos y P. Martín-Álvarez, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 201 (1995) 331.

68. M.C. Furtado, J. Dairy Sci., 66 (1983) 1822.

69. F. Addeo, L. Chianese y G. Anelli, Riv. Ital. Sci. Alim., 11 (1982) 37.

70. L. Szijarto y F.R. Van de Voort, J. Dairy Sci., 66 (1983) 620.

71. J.J. Basch, F.W. Douglas, Jr., L.G. Procino, V.H. Holsinger y H.M. Farrell, Jr., J. Daily Sci., 68 (1985) 23.

72. H. Meisel y J. Carstens, Milchwissenschaft, 44 (1989) 271.

73. L.K. Creamer y T. Richardson, Arch. Biochem. Biophys., 234 (1984) 476.

74. J.J. Basch, H.M. Farrell, Jr., R.A. Walsh, R.P. Konstance y T.F. Kumosinski, J. Dairy Sci., 72 (1989) 591.

75. M.H. Tunick, K.L. Mackey, J.J. Shieh, P.W. Smith, P. Cookey y E.L. Malin, Int. Dairy J., 72 (1989) 591.
76. Y.K. Jin y Y.W. Park, J. Food. Sci., 61 (1996) 490.
77. K. Dewettinck, S. Dierckx, P. Eichwalder y A. Huyghebaert, Lait, 77 (1997) 77.
78. W. Messens, J. Estepar-García, K. Dewettinck y A. Huyghebaert, Int. Dairy J., 9 (1999) 775.
79. T. Marshall, D. Gilliland y K.M. Williams, Biochem. Soc. Trans., 16 (1988) 165.
80. E. Molina, L. Amigo y M. Ramos, J. Food Prot., 61 (1998) 1691.
81. F. Addeo, L. Chianese, A. Di Luccia, P. Petrilli, R. Mauriello y G. Anelli, Milchwissenschaft, 38 (1983) 586.
82. G.E.Vegarud, T.S. Molland, M.J. Brovold, T.G. Devold, P. Alestrom, T. Steine, S. Rogne y T. Langsrud, Milchwissenschaft, 44 (1989) 689.
83. H. Bovenhuis y A.J.M. Verstege, Neth. Milk Dairy J., 43 (1989) 447.
84. F. Braun, I. Krause and I. Klostermeyer, Milchwissenschaft, 45 (1990) 3.
85. L. Moio, A. Di Luccia y F. Addeo, Electrophoresis, 10 (1989) 533.
86. L. Moio, L. Chianese, M. Rivemale y F. Addeo, Lait, 72 (1992) 87.
87. F. Addeo, L. Moio, L. Chianese, C. Stingo, P. Resmini, E. Berner, I. Krause, A. Di Luccia y A. Bocca, Milchwissenschaft, 45 (1990) 708.
88. F. Addeo, L. Moio, L. Chianese, C. Stingo y A. Di Luccia, Milchwissenschaft, 45 (1990) 221.
89. E. Ruiz Martínez y I. Santillana López, Alimentaria, 23 (1986) 55.
90. F. Addeo, L. Moio, L. Chianese y A. Di Luccia, Ital. J. Food Sci., 1 (1989) 45.
91. L. Amigo, M. Ramos, L. Calhau y M. Barbosa, Lait, 72 (1992) 95.
92. F.T.A. Chen y J.H. Zan, J. AOAC Int., 75 (1992) 905.
93. F.T.A. Chen y A. Tusak, J. Chromatogr. A, 685 (1994) 331.
94. N. De Jong, S. Visser y C. Olieman, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 207.

95. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro, P.M. Toppino, V. Denti, J. Chromatogr. A, 721 (1996) 345.

96. I. Recio y C. Olieman, Electrophoresis, 17 (1996) 1228.

97. I. Recio, M.L. Perez-Rodriguez, M. Ramos y L. Amigo, J. Chromatogr. A, 768 (1997) 47.

98. G.R. Paterson, J.P. Hill y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 105.

99. N.M. Kinghorn, G.R. Paterson y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 371.

100. A. Cifuentes, M. De Frutos y J.C. Diez-Masa, J. Dairy Sci., 76 (1993) 1870.

101. I. Recio, E. Molina, M. Ramos y M. De Frutos, Electrophoresis, 16 (1995) 654.

102. J.F. Fairise y P. Cayot, J.Agric. Food. Chem., 46 (1998) 2628.

103. I. Recio, L. Amigo y R. López-Fandiño, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 231.

104. K.R. Kristiansen, J. Otte, M. Zakora y K.B. Qvist, Milchwissenschaft, 49 (1994) 683.

105. M. Strickland, B.C. Weimer y J.R. Broadbent, J. Chromatogr. A, 731 (1996) 305.

106. I. Recio, M. De Frutos, A. Olano y M. Ramos, J. Agr. Food Chem., 44 (1996) 3955.

107. I. Recio, L. Amigo, M. Ramos y R. Lopez-Fandiño, J. Dairy Res., 64 (1997) 221.

108. J.R. Broadbent, M. Strickland, B.C. Weimer, M.E. Johnson y J.L. Steele, J. Dairy Sci., 81 (1998) 327.

109. M.D. Larsen, K.R. Kristiansen y T.K. Hansen, Int. J. Food Microbiol., 43 (1998) 215.

110. A.H. Pripp, R.O. Tobiassen, L. Stepaniak y T. Sorhaug, Lebensm. Wiss. Technol., 31 (1998) 177.

111. H. Wium, K.R. Kristiansen y K.B. Qvist, J. Dairy Res., 65 (1998) 665.

112. J. Otte, L. Midtgaard y K.B. Qvist, Milchwissenschaft, 50 (1994) 75.

VII. DETERMINATION OF COW'S MILK AND RIPENING TIME IN NONBOVINE CHEESE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF THE ETHANOL-WATER PROTEIN FRACTION

CHAPTER VII

DETERMINATION OF COW'S MILK AND RIPENING TIME IN NONBOVINE CHEESE BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF THE ETHANOL-WATER PROTEIN FRACTION

Chapter published in Electrophoresis (*Traducción al castellano en el anexo IV*).

Abstract

A novel method is reported for analyzing adulteration of goat and ewe cheeses with cow's milk: capillary zone electrophoresis (CZE) in isoelectric, acidic buffers (50 mM imino diacetic acid, IDA, pH = pI = 2.3). The cheese samples were extracted with a 20:80 v/v ethanol-water mixture in presence of 3 M urea and 1% β-mercaptoethanol for 1 h. After centrifugation and lipid extraction, the samples were dissolved in 50 mM IDA, 6 M urea and 0.5% hydroxyethyl cellulose and analyzed by CZE at 700 V/cm. A total of 18 characteristic peaks were resolved among the three types of cheeses and 18 variables were defined as their respective areas. There was excellent similarity among the electrophoretic patterns obtained with cheeses of a given type of milk, while cheeses made with different types of milk were easily distinguishable. Most peaks were common to all cheeses, but the profile differed depending on the type of milk used. Principal component analysis, linear discriminant analysis, and partial least squares regression (PLS) were used for statistical analysis of the data obtained by CZE. In particular, by using PLS multivariate regression, the contents of cow's milk in presumably pure goat and ewe cheeses, as well as in binary and ternary mixtures, could be predicted with relative standard deviations of *ca.* 6-7%. In addition, the ripening time in goat and ewe cheeses could also be predicted.

Key words: isoelectric buffers / capillary zone electrophoresis / cheese / proteins

VII.1. Introduction

Determination of animal origin of milk is a major issue concerning the quality control of cheese and other dairy products. In particular, the fraudulent adulteration of goat and ewe cheeses with cow milk is relatively common, which is due to: (i) seasonal fluctuations in the availability of goat and ewe milk; (ii) the higher price of goat milk, and particularly ewe milk, in comparison to cow milk; and (iii) the opportunity to use the overproduction of cow milk without loss of profit. Another important characteristic of cheese, also evaluated in quality control, is the ripening time. Although the chemical interpretation of the maturation processes is complicated and incomplete, this parameter is helpful in understanding taste and flavor.

Significant qualitative and quantitative information concerning the animal origin of cheese can be obtained from protein analysis. For this purpose, two approaches are possible: (i) to isolate characteristic proteins of the animal species of interest, to be evaluated and used for univariate calibration; (ii) to obtain a pattern or profile including peaks arising from several proteins, and to evaluate several features of this pattern to be used as variables in a multivariate calibration technique [1]. Approach (i) is most frequently used in the determination of cheese composition, whereas the evaluation of ripening time is usually addressed using approach (ii).

Ramos and Juarez [2] have evaluated the applicability of electrophoretic, immunoassay and liquid chromatographic methods to the determination of cow milk using approach (i). Pellegrino *et al.*[3] used reversed phase high performance liquid chromatography to determine cow milk in buffalo mozzarella as well as in goat [4] and ewe cheeses [5]. Molina *et al.* [6] predicted the percentages of cow, goat and ewe milk in Spanish Iberico cheeses by polyacrylamide gel electrophoresis of whey proteins. A multivariate approach for the identification of cow, goat and ewe milk samples using gas chromatography data for fatty acids, followed by linear discriminant analysis (LDA) was developed by Smeyers-Verbeke *et al.* [7].

The characterization of cheese maturity has been carried out by a variety of techniques, including slab gel electrophoresis [8, 9] and liquid chromatography [10-14]. Pham and Nakai [12] classified Cheddar cheeses according to ripening time on the basis of liquid chromatography of aqueous extracts, followed by stepwise LDA. A range of proteolysis parameters have been used for characterizing Spanish Manchego cheeses [15], as well as for predicting the ripening time by means of partial least-square regression (PLS) and other multivariate regression techniques [16].

High performance capillary electrophoresis (HPCE) is a fast, highly automated, efficient and quantitative technique for biopolymer analysis, well suited for quality control purposes in dairy industries and regulatory agencies. Recently, a number of studies have demonstrated that HPCE is a suitable technique for analyzing milk proteins [17], by using uncoated [18-28] and coated capillaries [29-39]. Cattaneo *et al.* [35] have demonstrated the capability of capillary zone electrophoresis (CZE) to analyze milk mixtures and to determine up to an 8% cow milk content. Cartoni *et al.* [38, 39] employed methyl silanized capillaries in the quantitation of up to a 2% cow milk in ewe and buffalo cheeses. In regard to cheese ripening time studies, Strickland *et al.* [26] employed HPCE to monitor and characterize chemical changes in Cheddar cheese during maturation.

Righetti's group [40-46] developed fast CZE procedures using isoelectric buffers, which due to their much reduced conductivities, are compatible with high voltage gradients, thus favoring high resolution with short migration times. These authors have suggested the use of isoelectric acidic buffers to separate peptides [41, 42], oligonucleotides [43, 44] and wheat [45] and maize proteins [46].

We report here the fast identification and quantitation of adulterations (by addition of cow's milk) of cheeses, elaborated with goat and/or ewe milk, on the basis of the protein patterns obtained by CZE analysis of an ethanol-water extract. The CZE separations were performed in a few minutes with an iminodiacetic acid isoelectric buffer. Several multivariate exploratory analyses, regression and prediction techniques were applied to the study of the CZE data. The electropherograms contained

information related to animal origin of the samples and ripening time. Statistical analysis was used for improving the determination of the cow milk content and ripening time in goat and ewe cheeses.

VII.2. Materials and methods

VII.2.1. Reagents

Iminodiacetic acid (IDA), urea and β-mercaptoethanol (β-ME) were obtained from Sigma (St.Louis, MO, USA), and hydroxyethylcellulose (HEC; average molecular mass, 27000 Da) was from Polysciences (Warrington, PA, USA). Deionized water was used throughout (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA).

VII.2.2. Apparatus

Uncoated fused-silica capillaries (27 cm total length, 20 cm effective length, 50 μm ID) were obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The CZE experiments were carried out with a P/ACE 2100 HPCE instrument, provided with a band-pass filter spectrophotometric detector, and controlled by System Gold software (Beckman, Fullerton, CA, USA) using an IBM PS/2 computer.

VII.2.3. Origin and preparation of samples

Cheese samples of guaranteed composition were supplied by Mercadona S.A. and Lácteas Toledo S.A. (Table VII.1). Portions of 0.2 g were extracted with a 20:80 v/v ethanol-water mixture in presence of 3 M urea and 1% β-ME for 1 h at room temperature under vigorous stirring. The extracts were centrifugated for 10 min at 7000 × *g*. Excess acetone was added to extract the lipids and to precipitate proteins.

After centrifugation at 7000 × *g* for 20 min, the pellet was dissolved in a buffer containing 50 mM IDA, 6 M urea and 0.5% HEC. To establish the adequate dilution factor prior to injection in the capillary, the protein concentration of each extract was determined by triplicate according to Peterson [47]. For a typical CZE experiment, a cheese extract diluted up to *ca.* 2 mg/ml protein was injected. The extracts were stored at -20 °C until use.

VII.2.4. CZE procedures

New capillaries were conditioned at 60 °C as follows: 5 min with 1 M NaOH, 5 min with 0.1 M NaOH, and 10 min with water. At the beginning of each working session the capillary was thermostated at 25 °C and rinsed for 30 min with the running buffer. The background electrolyte contained 50 mM of the IDA isoelectric buffer (pH = pI = 2.30 at 25 °C) supplemented with 0.5% HEC and 6 M urea (apparent pH 3.1). All buffers and samples were forced through Millipore 0.45 µm filters, and loaded in the capillary using hydrostatic pressure (0.5 psi) for 3 s. Separations were performed at 700 V/cm, with a typical current of 25 A. The signal was monitored at 214 nm. Additionally, since it was recently found that isoelectric buffers would not be completely stationary in the electric field, depending on their respective pI values [54], the analyte and catholyte solutions were changed after every set of five runs.

VII.3. Statistical analysis

VII.3.1. Exploratory analysis of data

Two multivariate statistical techniques for exploratory analysis of the data matrix were used, *i.e.*, principal component analysis (PCA) and dendrogram representations [48]. In PCA, a set of orthogonal vectors, which are called eigenvectors, and which are linear combinations of the original variables, is created. Eigenvectors are constructed in order of decreasing explained variance, thus, the first eigenvector covers as much of the variation in the data as possible. The second eigenvector is orthogonal to the first one and covers as much of the remaining variance as possible, and so on.

By plotting the projection of the samples on the planes of the 1st-2nd, 1st-3rd and 2nd-3rd eigenvectors, one can have the best possible views of the internal structure of the data matrix, and interpret sample interrelationships such as correlations and groups. Interrelationships among the original variables, and among these and the samples, can also be overviewed by plotting the projections of the variables on the same planes. Before using PCA, standardization of the data matrix is usually performed in order to give the same weigth to all the original variables.

The dendrogram is a scheme by which, according to the similarities, the samples are merged into hierarchical groups or clusters. A cluster begins in a given sample, which is linked to the most similar isolated sample or previously formed cluster. Two clusters are then merged to form a new cluster that replaces them. This process is repeated until only a single cluster is left. The algorithms used by the program differ in how they compute the similarity between the clusters [49, 50]. The variables can also be grouped by hierarchical clustering, which is useful for gathering information about the factors which control the system and which give rise to the variable groups. In this work, the dendrograms of the samples in the space of the

variables and *vice versa* were calculated using Euclidean distances as a measure of similarity. Both nonstandardized and standardized data were tried.

VII.3.2. Linear discriminant analysis

LDA is commonly used to classify samples into categories. It is based on an iterative search for the discriminant vectors that maximize the separation between categories and simultaneously minimize the intracategory variances [48]. The discriminant vectors are linear and orthogonal combinations of the original variables, and are obtained in order of decreasing discrimination power.

The objective is to provide a method for predicting into which category a new sample is most likely to fall. In addition, when the membership of the samples to the previously defined categories is known, an LDA gives a better view of the separation among categories than PCA. For this purpose, the projections of the samples on plane of the 1st-2nd discriminant vectors are plotted.

VII.3.3. Partial least squares regression

PLS is a powerful multivariate regression technique, which performs particularly well when various predictors of X-variables express common information, that is, when they are strongly colinear. For predicting a single response or Y-variable by using the information supplied by n X-variables, application of the PLS algorithm yields:

$$Y = t_1 L_1 + t_2 L_2 + ... + t_i L_i + ... + t_n L_n$$

where the L_i or latent variables are linear combinations of the original variables. A different PLS model is constructed by using one, two or more latent variables. The first latent variables collect both variance and correlation among the predictor variables and

the response, but the last ones contain only noise. Thus, the best models are those which explain a large percentage of the total variance of the data matrix with a minimum number of latent variables. The optimum number of latent variables to be included in the model should be defined in each case.

VII.4. Results and discussion

VII.4.1 Definition of the variables and construction of the data matrix

The training set used to define the variables was constructed by analyzing the nine cheese samples of a single origin, as indicated in Table VII.1. These include pure cow (C), goat (G) and ewe (E) cheeses. Each sample was analyzed in triplicate, and each time three injections were performed; thus, a total of 9 x 9 = 81 electropherograms constituted the training set. The electrophoretic profiles of three cheeses, each one elaborated with a different type of milk, are shown in Figure VII.1.

In order to define the variables, the electropherograms were compared by the ELECTRO program, developed in our laboratory. This program integrates the peak areas, and reduces the electropherogram to a scheme, in which the peaks are substituted by single lines. In this way, many schematized electropherograms can be simultaneously compared on the screen or printed. Several characteristic peaks common to all samples can also be used as references in order to correct small shifts of the migration time. This helped in selecting characteristic peaks of each type of milk, as well as peaks which were present in two or three types of milk, as variables. In this way, a total of 18 variables were defined as the areas of the 18 characteristic peaks indicated in Figure VII.1. Peaks 2 and 14 were used as references to correct migration times.

Table VII.1. Training samples

Manufacturer	Composition, C/G/E (%)[a]	Ripening time[b]
Don Nuño	100/0/0	L
Edam	100/0/0	H
Cadí	100/0/0	L
Capitol	100/0/0	L
Flor de Esgueva	0/0/100	L
Plantío	0/0/100	H
Roncal A	0/0/100	H
Montesinos	0/100/0	L
Rocinante	0/100/0	H

[a] Percentages of cow (C), goat (G) and ewe (E) milk declared by the manufacturer.
[b]Ripening time: low (L, fresh cheese) and high (H).

There was an excellent similarity among the electrophoretic patterns obtained with cheeses of a given type of milk (data not shown), while cheeses made with different types of milk were easily distinguishable. Thus, the peak labelled as 1 in Figure VII.1 was characteristic of cow cheeses, peaks 2, 13 and 14 were much larger than the other peaks in goat cheeses, and peaks 3 and 5-8 were particularly large in ewe cheeses. Most peaks were common to all cheeses, but the profile was different depending of the type of milk used.

In order to improve reproducibility, the peak areas were divided by the sum of the areas of the 18 peaks of the respective electropherogram. Then, the data matrix was standardized. The statistical studies that follow were performed with the PARVUS [51] and UNSCRAMBLER [52] packages.

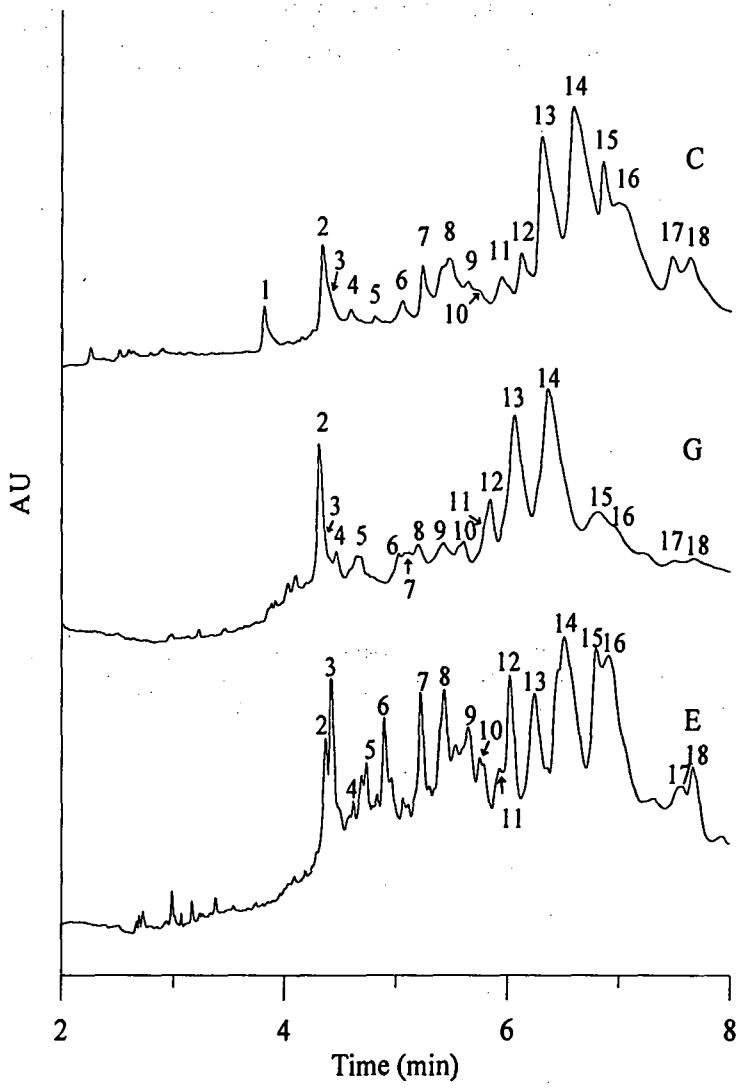


Figure VII.1. Electropherograms of a cow (C), a goat (G) and a ewe (E) cheeses, showing the 18 peaks selected as variables (60 mAUFS for each electropherogram). CZE conditions as given in Section VII.2.4.

VII.4.2. Exploratory data analysis by PCA

A first PCA plot showed three clusters which corresponded to the three genetic categories: C, G and E. Two out of the 81 runs (a Roncal A and a Montesinos run) were outliers and were therefore removed in all further studies. A biplot showing the projections of the samples (scores) and the variables (loadings) on the plane of the 1st and 2nd eigenvectors is given in Figure VII.2. The 1st and 2nd eigenvectors explained the 36 and 19% of the total variance, respectively; thus this plot showed the 55% of the total variance. The biplot also showed clusters of some variables. Thus, variables 3, 4, 5, 7, 9 and 10 showed a cluster associated with high ewe contents, and variables 1, 13, 14, and 15 gave a cluster associated with high cow contents. Finally, high values of variable 2 indicates large goat contents.

An interesting feature of Figure VII.2 is the G and E samples according to both genetic origin and ripening time. Each one of the G and E categories appeared as divided into two other categories, one containing the low (L) and the other one with the high (H) ripening time samples. Separation of the C categories according to the ripening time was unsuccessfully tried on the planes of the 1st-2nd, 1st-3rd and 2nd-3rd eigenvectors. The separation of the ripening time categories was enhanced by PCAs performed separately for the G and E categories (not shown).

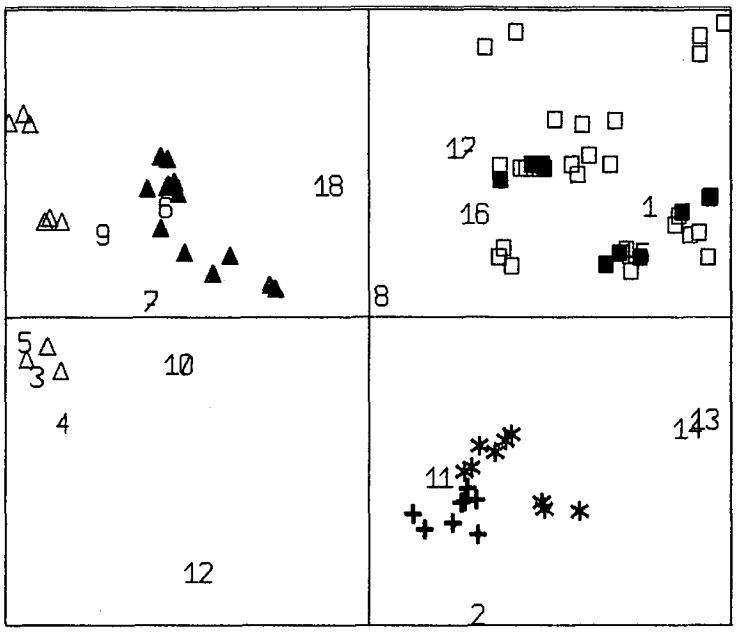


Figure VII.2. Biplot on the plane of the 1st and 2nd eigenvectors. The symbols used for representing the samples of the training set of Table VII.1 were: cow cheeses, (□) low and (■) high ripening time; goat cheeses, (+) low and (*) high ripening time; ewe cheeses, (Δ) low and (▲) ripening time. The numbers represent the original variables, plotted according to the respective loadings.

VII.4.3. Exploratory data analysis with dendrograms

A dendrogram of the samples sharply grouped them into the three genetic categories: C, G and E (not shown). Separation of the G and E samples into L and H ripening time clusters was also observed. As shown in Figure VII.3, a dendrogram of the variables indicated the following groups: (i) the cow group, consisting particularly by variables 1, 13-15 and 17; (ii) the isolated variable 2 which was characteristic of goat cheeses; and (iii) the ewe group, which included particularly variables 3-6 and 9-10. These groups agreed with the correlations among variables, which were observed in the PCA studies.

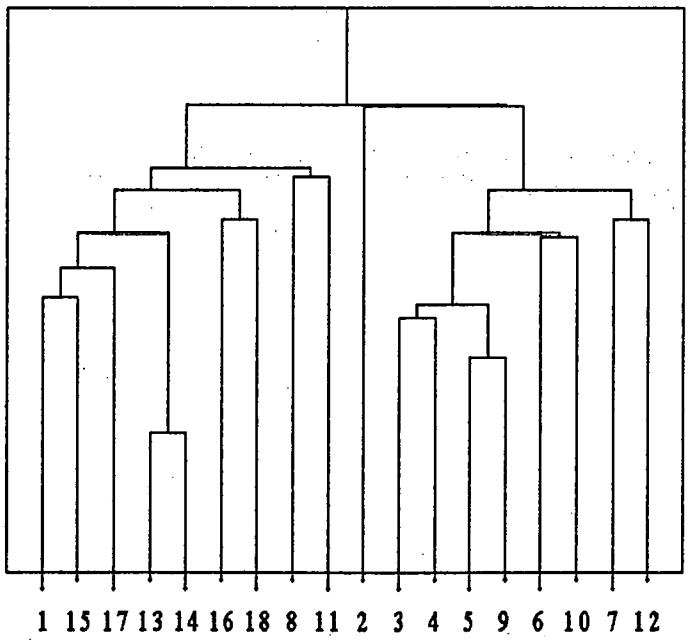


Figure VII.3. Dendrogram of the variables showing the cow (variables 1, 13-15 and 17) and ewe (variables 3-6 and 9-10) groups, and the isolated variable 2 which was characteristic of goat cheeses.

VII.4.4. Linear discriminant analysis

All the training samples of Table VII.1 were used to construct several LDA models. First, the samples were recognized as belonging to the C, G or E categories to construct the model. Afterwards, the model was applied to both the training and a few additional evaluation samples. These were several C/G binary and C/G/E ternary samples.

A projection of the training samples (triplicate runs by sample), on the plane of the 1st and 2nd discrimination vectors, is shown in Figure VII.4. The three genetic categories appeared sharply defined, in fact, the LDA correctly classified all the samples of the training set. The binary and ternary evaluation samples were projected at intermediate locations among the categories, as expected from their mixed composition (not shown).

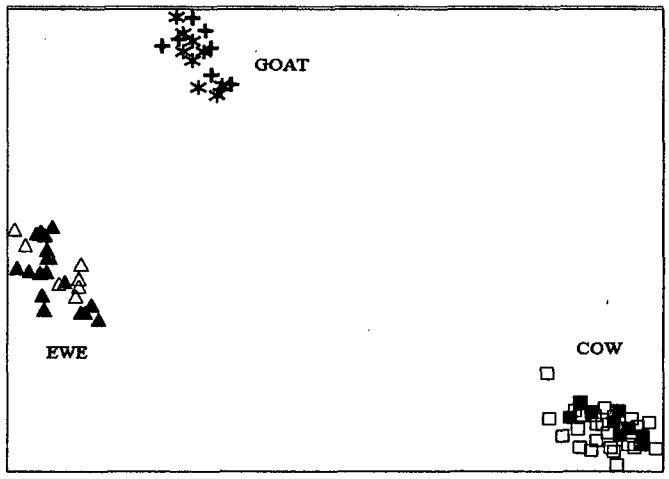


Figure VII.4. LDA plot based on the C, G and E categories. Projection of the training samples on the plane of the 1st and 2nd discrimination vectors (symbols as in Fig. VII.2).

Another LDA model was constructed by including the samples into the two ripening time categories, L and H. All L samples resulted in a single group, whereas the H goat and H ewe samples resulted in well-separated groups (Figure VII.5). Unfortunately, the H cow samples were ill-separated from the L cow samples. As shown in Figure VII.6, parts A-C, complete separation of the ripening time categories, including the L and H cow samples, was achieved by constructing an LDA model for each one of the three genetic categories. The variance contributed by the genetic origin was removed in these plots, which enhanced the separation of the ripening time categories. Thus, the unmistakable classification of cheese samples by both genetic and ripening time categories was achieved by using stepwise LDA with two chained models, the first one addressed to the genetic origin and the second one to ripening time.

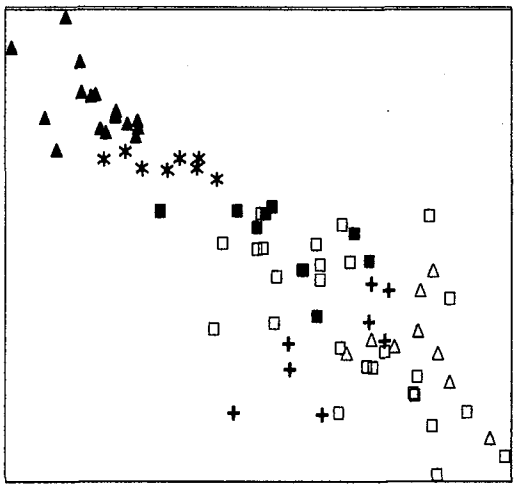
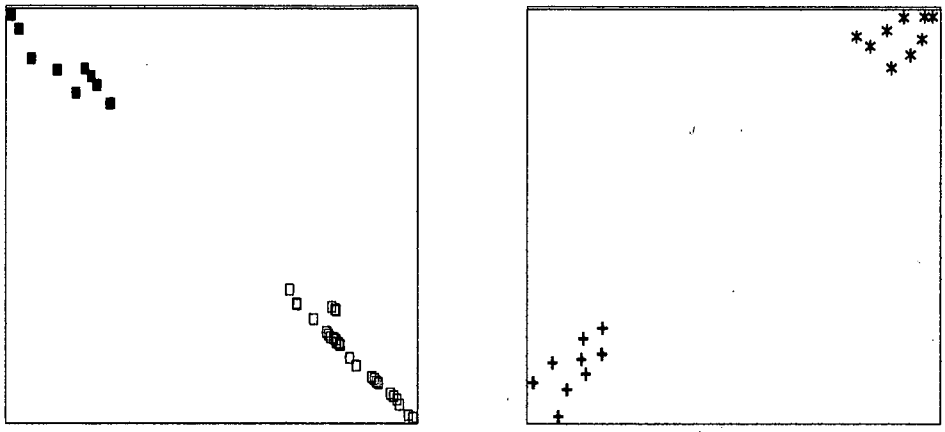
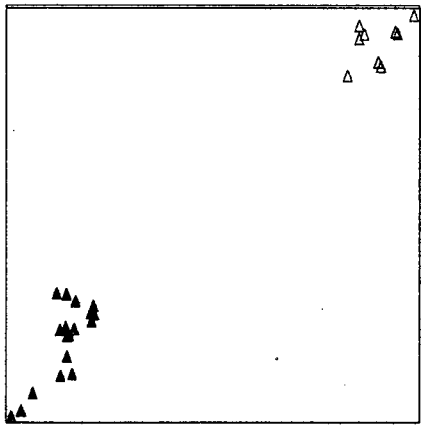


Figure VII.5. LDA plot based on the L and H ripening time categories. Projection of the training samples on the plane of the 1st and 2nd discrimination vectors (symbols as in Fig.VII.2).



A B



C

Figure VII.6. LDA plots based on the L and H ripening time categories. Projection of the (A) cow, (B) goat and (C) ewe samples on the plane of the 1st and 2nd discrimination vectors of LDA models constructed separately for the C, G and E categories (symbols as in Fig.VII.2).

VII.4.5. Construction of PLS models

In light of the results commented above, we constructed multivariate PLS models capable of evaluating the following variables: (i) the contents of cow milk (C%) in presumably pure goat and ewe cheeses, and in binary and ternary cheeses; and (ii) the ripening time (Rt) in cheeses, previously classified by genetic origin. The models were evaluated by comparing the predictions of the training set samples with the declared values.

For this purpose, the following variables were defined and added to the data matrix: (i) the percentages of cow (C%) and goat (G%) milk (two variables are enough to establish the composition of binary and ternary cheeses; thus the percentage of ewe was not included); and (ii) the ripening time, which was introduced as two simple possibilities, 0 or 100, standing for the low and high ripening times, respectively, since detailed information about ripening times was not available.

For each, the calibration samples and predictor variables to construct each PLS model are indicated in TableVII.2. First, only the 18 peak areas were included as X-variables to predict the concentration of cow milk (model 1 of Table VII.2). As observed in Table VII.2, accurate predictions, with standard deviations of *ca.* 6-7%, were achieved. The results did not improve by including the ripening time as an additional predictor variable (model 2).

Accuracy and precision improved slightly when two different PLS models, one for low and another for high ripening time cheeses were constructed (models 3 and 4, respectively).

Table VII.2. Prediction of the cow milk content and ripening time with different PLS models

Model no.	Samples[a]	Predictor variables[b]	Response variable	Optimum no. of latent variables	Explained variance, %	Predicted ± s[c], % (no. of data)	
						Ref. 100 %	Ref. 0 %
1	All	18	C%	4	97.9	99.0 ± 7.3 (36)	0.8 ± 6.2 (43)
2	All	18+Rt	C%	4	97.9	99.0 ± 7.6 (36)	0.9 ± 6.1 (43)
3	L	18	C%	4	98.2	99.4 ± 6.7 (27)	0.9 ± 4.4 (17)
4	H	18	C%	2	98.5	99.1 ± 4.7 (9)	0.3 ± 5.0 (26)
5	All	18	Rt	5	52.6	78 ± 28 (35)	18 ± 22 (44)
6	All	18+C%+G%	Rt	6	54.3	79 ± 27 (35)	17 ± 22 (44)
7	C	18	Rt	3	15.8	48 ± 6 (9)	17 ± 23 (27)
8	G	18	Rt	2	97.5	99.2 ± 6.7 (9)	0.9 ± 7.2 (8)
9	E	18	Rt	3	97.0	99.3 ± 5.0 (17)	1.3 ± 9.4 (9)

[a] Samples included in the calibration set: all samples of Table VII.1 (All); from these, only low (L) or high (H) ripening time samples, or only pure cow (C), goat (G) or ewe (E) samples.

[b] Variables used to construct the model: only the normalized areas of the 18 peaks, or these with the ripening time added (Rt), or with the percentages of cow (C%) and goat (G%) added.

[c] Standard deviation.

In addition, models 5-9 of Table VII.2 were constructed to assess the capability of the procedure to predict the ripening time. Unsatisfactory results were obtained by using all the samples and the 18 peak areas to predict the ripening time (model 5). This was attributed to the lack of separation of the L and H categories of cow milk, which agreed with the results previously obtained by PCA and the dendrograms. Further, no advantage was achieved by adding the cow and goat contents as predictor variables (model 6), and errors increased when a PLS model for the cow samples was constructed separately for the G and E categories (model 7). Finally, predictions improved dramatically when the G and E categories were treated separately (models 8 and 9, respectively). Thus, the ripening time in goat and ewe cheeses were predicted with standard deviations of *ca.* 5-9%.

VII.4.6. Prediction of the cow's contents and ripening times by PLS

The best models (Table VII.2) were applied to predict the percentage of cow milk and the ripening time of some additional evaluation samples, including pure, binary and ternary cheeses. Two or three portions of each evaluation sample were extracted and analyzed in triplicate, and the electropherograms were treated as done previously with the calibration samples. The results, which were compared with reference values declared by the manufacturer, or obtained by the SDS-PAGE procedure [53] in other laboratories, are given in Table VII.3.

Model 1 (to predict C% without distinguishing L and H samples) and model 3 (to predict C% in L samples) gave satisfactory predictions of C% in terms of accuracy and precision. However, model 4 (to predict C% in H samples) gave low C% values. Models 8 and 9 correctly classified G and E samples as having a high ripening time.

Table VII.3. Prediction of cow milk content and ripening time in several evaluation samples using different PLS models

Manufacturer	Composition and ripening time	Response variable	Model no.	Predicted ± s (no. of data)	Reference value, %
Entrepinares	C/G/E, H	C%	1	56 ± 3 (8)	70-90% [a]
			4	43 ± 4 (8)	
Puente Cesta	C/G/E, H	C%	1	54 ± 4 (6)	50-75% [a]
			4	35 ± 4 (6)	
Flor de Ronda A	C/G, L	C%	1	77.9 ± 1.6 (6)	80-95% [a]
			3	90 ± 3 (6)	
Flor de Ronda B	C/G, H	C%	1	73 ± 4 (9)	80-95% [a]
			4	57.6 ± 1.3 (9)	
Roncal B	E, H	C%	1	-4 ± 8 (9)	Not detected [a]
			4	-7 ± 5 (9)	
Lácteas Toledo A	G, H	C%	1	-8 ± 3 (5)	Absent [b]
			4	-8 ± 8 (5)	
Lácteas Toledo B	C/G/E, H	C%	1	53 ± 5 (5)	60% [b]
			4	36 ± 4 (5)	
Roncal B	E, H	Rt	9	117 ± 9 (9)	100 [c]
Lácteas Toledo A	G, H	Rt	8	120 ± 13 (5)	100 [c]

[a] Obtained by SDS-PAGE according to ref. [53] in another laboratory.
[b] Declared by the manufacturer.
[c] Reference value used in this work to codify H samples.

VII.5. Conclusions

It has been shown that a CZE electropherogram of the ethanol-water protein fraction contains enough information to classify cheeses according to both genetic origin and ripening time. On the basis of the electropherograms, and using PLS multivariate regression, the contents of cow's milk in presumably pure goat and ewe cheeses, as well as in binary and ternary mixtures, can be predicted with relative standard deviations of *ca.* 6-7%. This includes cheeses of low and high ripening time. The ripening time of goat and ewe cheeses can also be predicted.

VII.6. References

1. J.J. Breen and P.E. Robinson, "Environmental Application of Chemometrics", ACS Symposium Series 292, American Chemical Society, Washington, DC, 1985.
2. M. Ramos and M. Juarez, Int. Dairy Fed. Bull., 202 (1986) 175.
3. L. Pellegrino, I. De Noni, A. Tirelli and P. Resmini, Sci. Tec. Latt.-Cas., 42 (1991) 87.
4. I. De Noni, A. Tirelli and F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 47 (1996) 7.
5. L. Pellegrino, A. Tirelli and F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 43 (1992) 297.
6. E. Molina, M. Ramos and P. Martin-Alvarez, Z. Lebensm.Unters. Forsch., 201 (1995) 331.
7. J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart and D. Coomans, J. Ass. Off. Anal. Chem., 60 (1977) 1382.
8. A. Marcos, M.A. Esteban, F. Leon and J. Fernández-Salguero, J. Dairy Sci., 62 (1979) 892.
9. K. Dewettinck, S. Dierckx, P. Eichwalder and A. Huyghebaert, Lait, 77 (1997) 77.
10. K. Kaminogawa, T.R. Yan, N. Azuma and K. Yamauchi, J. Food Sci., 51 (1986) 1253.
11. R. Marsilli, J. Dairy Sci., 68 (1985) 3155.
12. A.M. Pham and S. Nakai, J. Dairy Sci., 67 (1984) 1390.
13. G.F. Amantea, B.J. Skura and S. Nakai, J. Food Sci., 41 (1986) 912.
14. C. Polo, M. Ramos and R. Sánchez, Food Chem., 16 (1985) 85.
15. G. Santa-Maria and M. Ramos, Food Chem., 19 (1986) 225.
16. A.G. Ruiz, L. Cabezas, P.J. Martin-Alvarez and D. Cabezudo, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 206 (1998) 382.
17. I. Recio, L. Amigo and R. Lopez-Fandiño, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 231.

18. J. Otte, K.R. Kristiansen, M. Zakora and K.B. Qvist, Neth. Milk Dairy J., 48 (1994) 81.

19. J. Otte, L. Midtgaard and K.B. Qvist, Milchwissenschaft, 50 (1994) 75.

20. I. Recio, E. Molina, M. Ramos and M. De Frutos, Electrophoresis, 16 (1995) 654.

21. M. De Frutos, E. Molina and L. Amigo, Milchwissenschaft, 51 (1996) 374.

22. I. Recio, M. De Frutos, A. Olano and M. Ramos, J. Agr. Food Chem., 44 (1996) 3955.

23. G.R. Paterson, D.E. Otter and J.P. Hill, J. Dairy Sci., 78 (1995) 2637.

24. G.R. Paterson, J.P. Hill and D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 105.

25. N.M. Kinghorn, G.R. Paterson and D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 371.

26. M. Strickland, B.C. Weimer and J.R. Broadbent, J. Chromatogr. A, 731 (1996) 305.

27. I. Recio, M.L. Perez-Rodriguez, M. Ramos and L. Amigo, J. Chromatogr. A, 768 (1997) 47.

28. J.F. Fairise and P. Cayot, J. Agric. Food. Chem., 46 (1998) 2628.

29. N. De Jong, S. Visser and C. Olieman, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 207.

30. A. Cifuentes, M. De Frutos and J.C. Diez-Masa, J. Dairy Sci., 76 (1993) 1870.

31. M. Kanning, M. Casella and C. Olieman, LC-GC Int., 6 (1993) 701.

32. J. Van Riel and C. Olieman, Electrophoresis, 16 (1995) 529.

33. N.M. Kinghorn, C.S. Norris, G.R. Paterson and D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 111.

34. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro, P.M. Toppino and V. Denti, J. Chromatogr. A, 721 (1996) 345.

35. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro and G.F. Greppi, Milchwissenschaft, 51 (1996) 616.

36. I. Recio and C. Olieman, Electrophoresis, 17 (1996) 1228.

37. B. Vallejo-Cordoba, J. Capil. Electrophor., 4 (1997) 219.
38. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska and M. Masci, Ital. J. Food Sci., 10 (1998) 317.
39. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska and M. Masci, Ital. J. Food Sci., 10 (1998) 127.
40. A.V. Stoyanov and P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 790 (1997) 169.
41. P.G. Righetti and F. Nembri, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 203.
42. A. Bossi and P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 2012.
43. C. Gelfi, M. Perego and P.G. Righetti, Electrophoresis, 17 (1996) 1470.
44. A.V. Stoyanov, C. Gelfi and P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 717.
45. L. Capelli, F. Forlani, F. Perini, N. Guerrieri, P. Cerletti and P.G. Righetti, Electrophoresis, 19 (1998) 311.
46. P.G. Righetti, E. Olivieri and A. Viotti, Electrophoresis, 19 (1998) 1738.
47. G.L. Peterson, Anal. Biochem., 83 (1977) 346.
48. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman, Chemometrics: A Textbook, Elsevier, Amsterdam, 1989.
49. D.L. Massart and L. Kaufman, The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis, Wiley-Interscience, New York, 1983.
50. P. Willett, Similarity and Clustering in Chemical Information System, Research Studies Press, Letchworth, UK, 1987.
51. M. Forina, S. Lanteri, C. Armanino, R. Leardi and G. Drava, PARVUS: An Extendable Package of Programs for Data Explorative Analysis, Classification and Regression Analysis, University of Genova, Italy, 1998.
52. Unscrambler 7.01 User's Guide 1998 CAMO ASA, Trondheim, Norway.
53. L. Amigo, G. Santa-María, M. González-Llano and M. Ramos, XII Int. Dairy Congress, The Hague, Netherlands, 152, 1986.
54. A. Bossi, E. Olivieri, L. Castelleti, C. Gelfi, M. Hamdan and P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 853 (1999) 71.

VIII. DETERMINATION OF COW'S MILK IN NON-BOVINE AND MIXED CHEESES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF WHEY PROTEINS IN ACIDIC ISOELECTRIC BUFFERS

CHAPTER VIII

DETERMINATION OF COW'S MILK IN NON-BOVINE AND MIXED CHEESES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS OF WHEY PROTEINS IN ACIDIC ISOELECTRIC BUFFERS

Chapter published in Journal of Chromatography A (*Traducción al castellano en el anexo V*).

Abstract

An improved method for determination of cow's milk in non-bovine cheese is reported: electrophoresis of whey proteins in acidic, isoelectric buffers. Two background electrolytes (BGEs) have been tested: (i) 50 mM iminodiacetic acid (pH = isoelectric point = 2.30 at 25°C), 0.5% hydroxyethylcellulose, 0.1% Tween 20 and 6 M urea (apparent pH 3.1), E = 300 V/cm, for the separation of α-lactalbumins (α-LAs); (ii) a BGE with the same composition, but supplemented with 10% Tween 20, E = 450 V/cm, for the fractionation of β-lactoglobulins (β-LGs). Surfactants have a discriminating effect on the retention behaviour of the bovine α-LA and β-LG proteins, owing to the different strength of the protein-surfactant association complexes, and are needed for separating these two proteins from small peaks in the electropherograms generated by degradation of casein during cheese ripening. Novel equations are given for deriving the ratio of the area (or height) of bovine α-LA, or β-LG, to the area (or height) of ovine or caprine α-LA or β-LG (such ratios being typically used to determine the percentage of cow's milk in dairy products), since previous equations had marked drawbacks, such as non-linearity of the plots with increasing slopes at high cow's milk percentages, and too broad confidence limits at high cow's milk contents, where the peak area (or height) ratio tends asymptotically to infinite. With the novel procedures here reported, contents of cow's milk as low as 1% can be quantified in goat's and ewe's cheeses. The present protocols

give lower detection limits, are cheaper and more rapid than any other methodology reported in the literature, and can be easily applied to the routine quality control of binary and ternary cheeses.

Key words: cheese / food analysis / proteins / whey proteins

VIII.1. Introduction

Dairy products, which constitute a major component of human food, are protected in almost all countries by specific laws. According to law, the animal origin of the milk used for manufacturing cheese must be declared by the producer; however, adulteration of goat and ewe cheese with cow's milk is relatively common, owing to: (i) seasonal fluctuations in the availability of goat's and ewe's milk; (ii) higher price of goat's milk, and particularly ewe's milk, in comparison to cow's milk; (iii) opportunity to use the overproduction of cow's milk without loss of profit. Therefore, reliable, rapid and sensitive control methods must be available to check the composition of milk, cheese and other dairy products.

This problem has been addressed by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), slab gel electrophoresis and column liquid chromatographic methods. Richter *et al.* [1] developed an indirect competitive ELISA technique based on the evaluation of caseins and glycomacropeptides in milk. Beer *et al.* [2] also used ELISA for estimating bovine β-lactoglobulin in milk.

Gel isoelectric focusing has been used for analysing whey proteins [3-5] and caseins [6, 7]. Molina *et al.* [8] predicted the percentages of cow's, goat's and ewe's milk in "Iberico" cheese by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of whey proteins, and Ramos and Juarez [9] evaluated the applicability of electrophoresis and immunoassay in milk mixtures. Both ELISA and slab gel electrophoresis provide semiquantitative valuable information, but they are slow, labour intensive and cannot detect small amounts of cow's milk in goat and ewe products. Chromatographic techniques in their different modes

(reversed-phase, ion-exchange and size-exclusion) have also been applied to the evaluation of whey proteins [10-12]. Reversed-phase high-performance liquid chromatography has been used to determine cow's milk in buffalo mozzarella [13] as well as in goat [14] and ewe cheeses [15]. Chromatography has proved to be a valuable quantitative technique for protein analysis in dairy products; however, separation time is usually within the 30-50 min range, which is rather long for some routine quality control purposes.

Recently, a number of studies have demonstrated that high-performance capillary electrophoresis (HPCE) is a suitable technique for analysing milk proteins [16] by using uncoated [17-27], and coated capillaries [28-38]. Cattaneo *et al.* [34] have demonstrated the capability of an HPCE mode, i.e., capillary zone electrophoresis (CZE), to determine up to an 8% level of cow's milk in milk mixtures. Recently, Cartoni *et al.* [37, 38] employed methyl silanized capillaries in the determination of down to 2% cow's milk in ewe and buffalo cheeses.

Righetti *and* co-workers [39-45] have developed fast CZE procedures using isoelectric buffers, which, due to their much reduced conductivities, are compatible with high voltage gradients, thus favouring high resolution with short migration times. These authors have used isoelectric acidic buffers for separating peptides [40, 41], oligonucleotides [42, 43] and wheat [44] and maize proteins [45].

We report here the fast identification and quantitation of cow's milk in goat and ewe cheeses on the basis of the CZE separation of whey proteins. Isoelectric buffers containing iminodiacetic acid and different concentrations of a non-ionic surfactant (Tween 20) were used.

VIII.2. Materials and methods

VIII.2.1. Reagents

Iminodiacetic acid (IDA), urea and bovine standards of α-lactalbumin (α-LA) and β-lactoglobulins (β-LGs) A and B were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

The caprine and ovine α-LA and β-LG used as standards were purified in the laboratory by slab gel isoelectric focusing. Acetic acid and tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) were from Fluka (Buchs, Switzerland). Hydroxyethylcellulose (HEC; average molecular mass, 27000 Da) was from Polysciences (Warrington, PA, USA). A buffer containing 0.3 M acetic acid and the necessary 2 M Tris for reaching pH 4.6 was prepared. Deionized water was used throughout (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA).

VIII.2.2. Apparatus

Fused-silica uncoated capillaries (33.5 cm × 50 μm ID × 375 μm OD) were obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The CZE experiments were carried out with an HP^{3D} capillary electrophoresis system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), equipped with a diode array spectrophotometric detector.

VIII.2.3. Origin and preparation of samples

Samples of cow, goat and ewe cheeses of guaranteed composition, including cheeses of a single animal origin, and binary and ternary mixtures, were supplied by Mercadona and Lácteas Toledo (Spain). Cheeses of guaranteed single animal origin were used to prepare several binary and ternary mixtures to be used as standards. For this purpose, fresh and ripened cow, goat and ewe cheeses provided by several manufacturers were used. Other cheese samples, elaborated with binary and ternary milk mixtures, were also used as standards and for evaluation purposes. In the latter case, both the composition declared by the manufacturer or SDS-PAGE data were available (Table VIII.1). Sample preparation was similar to that proposed by Pellegrino *et al.* [14] but with some modifications. Thus, 0.5 g cheese samples were mixed with 1 ml distilled water and shaken at room temperature for 5 min in a vortex mixer. The extracts were centrifuged at 12000 rpm (16500 *g*) for 15 min at 4°C. A 500 μl aliquot of the supernatant was diluted with 250 μl of the acetic acid/Tris buffer of pH 4.6, left

to stand for 20 min, and centrifuged again for 15 min. Desalted and preconcentrated samples were obtained with Microcon membranes of 10000 M_r cut-off (Amicon, Millipore, Bedford, MA, USA). After centrifugation on the Microcon tubes at 8000 rpm (11000 *g*) for 30 min, the extracts were stored at -20°C until needed.

Table VIII.1. Declared and found cow's milk contents (in percentages) for a series of commercial Spanish cheeses

Manufacturer [a]	Reference	Found from α-LAs	Found from β-LGs
Entrepinares (H)	70-90 [b]	73 ± 3	67 ± 5
Puente Cesta (H)	50-75 [b]	60 ± 2	57 ± 4
Flor de Ronda (L)	80-95 [b]	92 ± 3	90 ± 6
Flor de Ronda (H)	80-95 [b]	96 ± 3	92 ± 6
Roncal (H)	Pure ewe [c]	ND [d]	ND [d]
Don Bernardo (H)	Pure ewe [c]	10 ± 2	8 ± 4
Alquerías del Niño Perdido (H)	Pure goat [c]	30 ± 3	28 ± 5
Lácteas Toledo (L)	Pure goat [c]	ND [d]	ND [d]
Lácteas Toledo (H)	60 [c]	60 ± 2	55 ± 4

[a] Ripening time between parentheses: L, fresh cheese; H, ripened cheese.

[b] Obtained by SDS-PAGE according to ref. [4] in another laboratory.

[c] Declared by the manufacturer.

[d] Not detected.

VIII.2.4. Recommended CZE procedures

New capillaries were conditioned at 60°C as follows: 5 min with 1 M NaOH, 5 min with 0.1 M NaOH, and 10 min with water. At the beginning of each working session the capillary was rinsed for 30 min with the running background electrolyte (BGE) at 25°C. No alteration of the baselines were observed using a rinse time of 2 min between samples. The two following BGEs and electric fields are recommended:

(i) For the separation of α-LAs: 50 mM IDA (pH = pI = 2.30 at 25°C, where pI=isoelectric point), 0.5% HEC, 0.1% Tween 20 and 6 M urea (apparent pH 3.1). E = 300 V/cm.

(ii) For the separation of β-LGs: a BGE with the same composition, but supplemented with 10% Tween 20. E = 450 V/cm.

All buffers and samples were pressed through 0.45 μm Millipore filters, and loaded in the capillary using hydrostatic pressure (50 mbar) for 3 s. The signal was monitored at 214 nm.

VIII.3. Results and discussion

VIII.3.1. Separation of α-LAs of different animal origin

A BGE containing 50 mM IDA, 0.5% HEC and 6 M urea, and an electric field of 700 V/cm, was first used. The electropherograms of the fractions of ripened cheeses of a single animal origin, which were retained by the Microcon membranes, are shown in Figure VIII.1 A-C. The α-LA and β-LG peaks were identified in all cases by spiking the cheese extracts with the protein standards. Fresh cheeses gave similar electropherograms, which showed the same main peaks but with a simpler baseline. Retention of the proteins by the membranes was checked by also injecting the filtrates; in all cases, the α-LA and β-LG peaks were not present (electropherograms not shown). In addition, the electropherograms of the retained fractions were also injected after dilution to 50% with water. The peak areas showed a 50% reduction, which indicated the absence of non-linear effects, such as those associated to sample viscosity.

The α-LAs appeared at the same migration time for the goat and ewe samples (Figure VIII.1 B and C, peaks 4 and 6, respectively), but at a different time for the cow's samples (Figure VIII.1 A, peak 1). Unfortunately, in ripened cheeses, the cow's α-LA overlapped with a small peak of the goat and ewe samples, adjacent to the

corresponding α-LA peak. This is shown in Figure VIII.1 D, which corresponds to a ewe extract spiked with 200 mg/l bovine α-LA. Small peaks adjacent to α-LA peaks are usually due to casein degradation products during cheese ripening [14]. These small peaks were absent in fresh cheeses. On the other hand, the β-LGs peaks appeared at similar migration times in all samples. Thus, a peak for the adequate evaluation of goat-ewe mixtures was not present in these electropherograms, and the evaluation of small amounts of cow's milk in ripened ewe cheeses was subjected to bias owing to overlapping of the cow's α-LA peak with a low but not negligible peak of the goat and ewe profiles.

Xu *et al.* [46] found that Tween 20 and other non-ionic surfactants have a discriminating effect on the retention behaviour of the bovine α-LA and β-LG proteins owing to the different strength of the protein-surfactant association complexes. Therefore, a 0.1% Tween 20 was added to the BGE. Also, the electric field was decreased to 300 V/cm. As shown in Figure VIII.2, in the presence of surfactant, simpler baselines, higher efficiencies and differential shifts in the peaks of the bovine, caprine and ovine α-LAs were produced. The peaks of the three α-LAs appeared at different migration times, thus making possible the determination of binary and ternary mixtures. Furthermore, as shown in Figure VIII.2 D, the bovine α-LA peak (added to a ewe sample) appeared in a flat background region of the ewe electropherograms, well resolved from the small peak exhibited by the samples of ripened ewe cheese at a migration time slightly over the ovine α-LA peak. Similarly, the bovine α-LA peak appeared at a migration time between the caprine α-LA peak (number 4 in Figure VIII.2) and the small peak showed by the ripened goat cheeses at a larger migration time (Figure VIII.2 B), well resolved from the former and satisfactorily resolved from the later (results not shown).

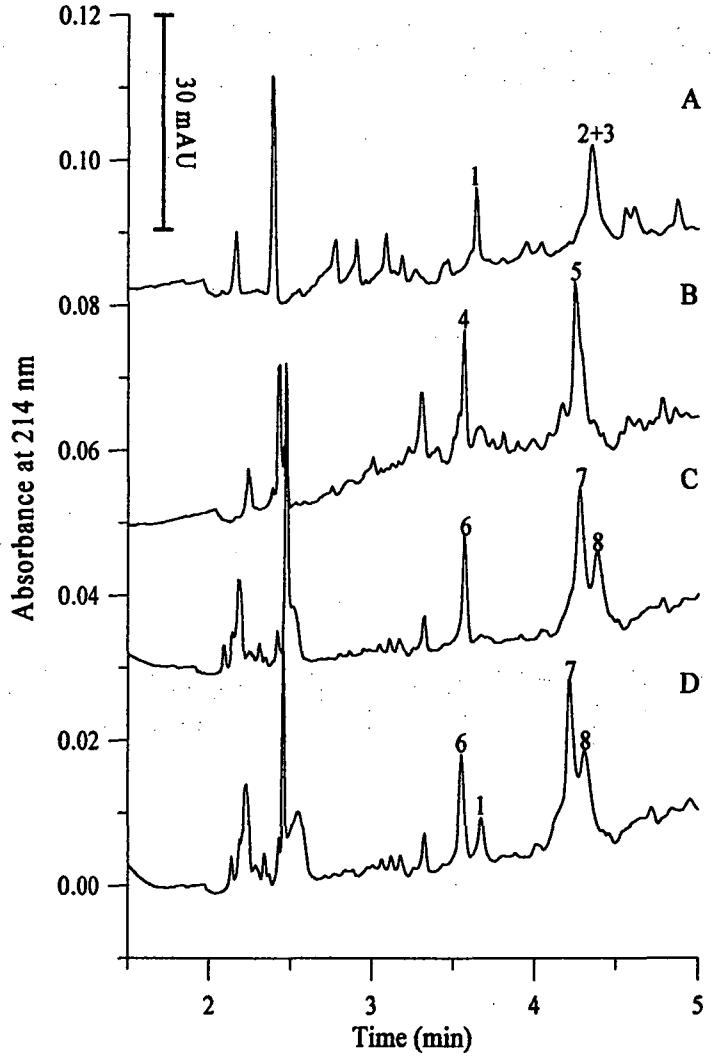


Figure VIII.1. Electropherograms of whey from (A) cow (B) goat and (C) ewe ripened cheeses. Electropherogram (D): ewe's extract spiked with 200 mg/l of bovine α-LA. Capillary: 33.5 cm (effective length 25 cm) × 50 μm I.D.; hydrodynamic injection: 50 mbar × 3 s; running buffer: 50 mM IDA, 6 M urea and 0.5% HEC; electric field: 700 V/cm (resulting in a current of 27 μA); detection at 214 nm. Peak identification : 1, bovine α-LA; 2, bovine β-LG A; 3, bovine β-LG B; 4, caprine α-LA ; 5, caprine β-LG; 6, ovine α-LA; 7, ovine β-LG A; 8, ovine β-LG B.

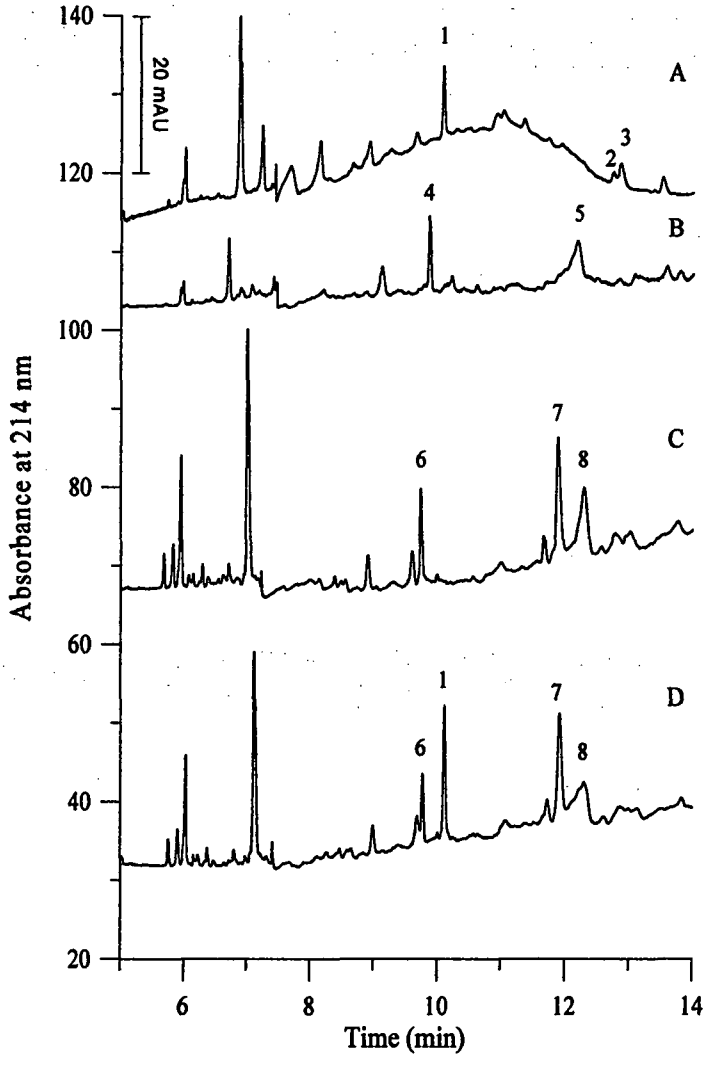


Figure VIII.2. Electropherograms of whey from (A) cow, (B) goat and (C) ewe ripened cheeses. Electropherogram (D): ewe's extract spiked with 200 mg/l of bovine α-LA. Running buffer: as in Fig.VIII.1 but supplemented with 0.1% Tween 20 [BGE (i)]; electric field: 300 V/cm (resulting in a current of 11 μA). Peak identification and other conditions as in Fig.VIII.1.

The experiments were also performed at 500 V/cm, but a better resolution was obtained at 300 V/cm. With this electric field and using the recommended BGE (i), cheese samples elaborated with mixtures of goat-cow and ewe-cow milk, and with a mixture of the three types of milk, were injected. As shown in electropherogram of Figure VIII.3, excellent separation among the three α-LAs was achieved (peaks 6, 4, 1 representing α-LAs from ewe, goat and cow, respectively). The peak located between peaks 4 and 1 appeared only in ripened cheeses, and in the electropherogram showed in Figure VIII.3 this peak was particularly large, thus it was attributed to a degradation product. To measure the peak areas, the baseline was drawn by connecting the valley bottoms.

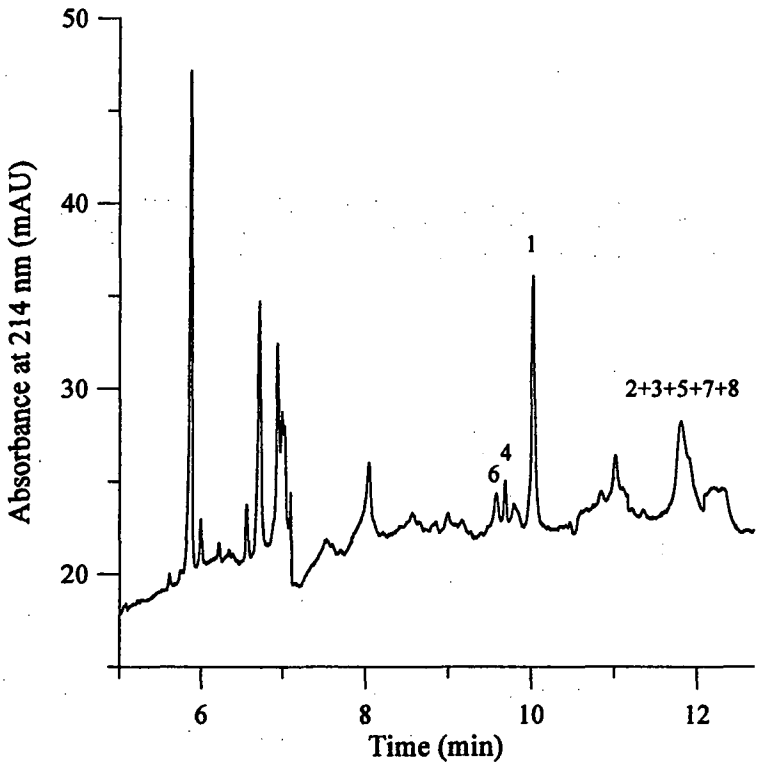


Figure VIII.3. Electropherogram of whey from a ternary cheese (Table VIII.1, Entrepinares, ripened) with the following composition: C, 70%; G, 15%; E, 15%. Separation conditions as in Fig. VIII.2 and peak identification as in Fig. VIII.1.

VIII.3.2. Separation of β-LGs of different animal origin

The possibility of using not only the α-LAs, but also the β-LGs, for developing improved procedures for the determination of the composition of binary and ternary cheeses, was studied. In order to achieve a better resolution of the β-LGs of different animal origin, the BGE composition was modified. First, the influence of the urea concentration within the 6-9 M range was examined. When the concentration of urea increased, the pH of the BGE also increased (up to 3.3 with 9 M urea), and the resolution improved up to 8 M, but remained unaffected at a higher urea concentration. Resolution of the bovine, ovine and caprine β-LGs also improved by increasing the Tween 20 concentration up to 15%, but sensitivity decreased by more than 10%. As shown in Figure VIII.4, with a 10% Tween 20, the peaks of the three β-LGs appeared at different migration times, thus making possible the determination of mixtures. A drawback was the progressive loss of resolution between the caprine and ovine α-LA peaks as the Tween 20 concentration increased. This confirmed that the optimization of the separation of the α-LAs and the β-LGs of different origin in two independent procedures, was a better choice than the joint optimization of the separation of the α-LA and β-LG peaks. The high Tween 20 concentration also led to an undesirable increase of the β-LGs migration times. In order to offset this effect, thus reducing analysis time, the electric field was increased. Thus, a BGE containing 8 M urea and 10% Tween 20, and an electric field of 450 V/cm, was selected.

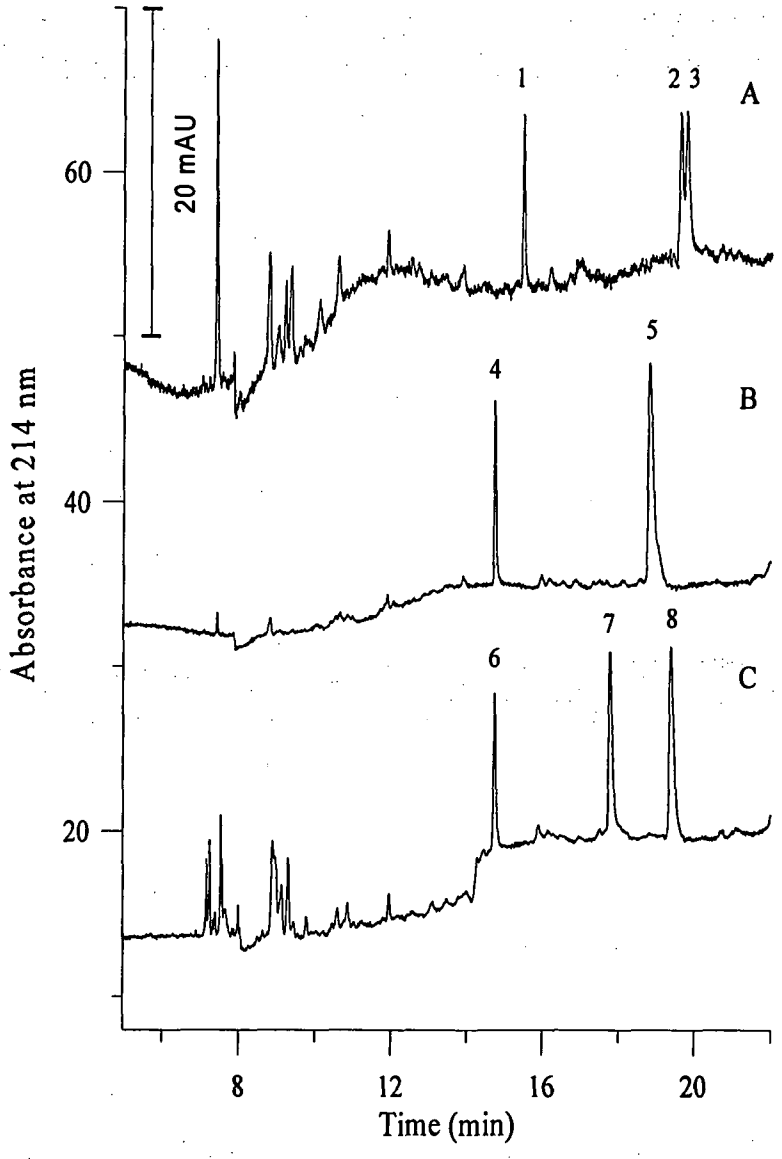


Figure VIII.4. Electropherograms of whey from (A) cow, (B) goat and (C) ewe ripened cheeses. Running buffer: 50 mM IDA, 8 M urea, 0.5% HEC and 10% Tween 20; electric field: 450 V/cm (resulting in a current of 10 μA); detection at 214 nm. Peak identification and other conditions as in Fig. VIII.1.

An electropherogram of a ternary mixture obtained in these conditions is shown in Figure VIII.5. As can be observed, the peaks of the β-LGs of different animal origin, including the bovine and ovine A and B genetic varieties (as confirmed by spiking the extracts with the corresponding standards), were resolved (see peaks 8, 7, 5, 2 and 3 in the 17 to 20 min elution window).

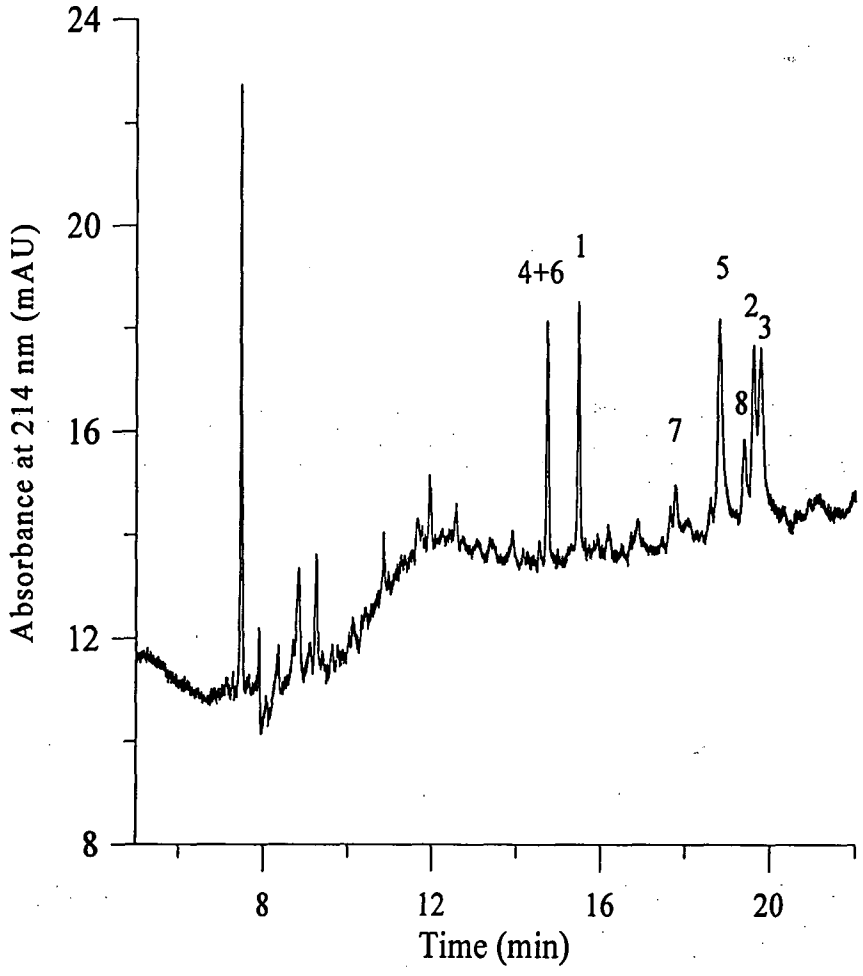


Figure VIII.5. Electropherogram of whey from a ternary cheese. Running buffer and other conditions as in Fig. VIII.4.

VIII.3.3. Quantitation studies

The ratio of the area (or height) of bovine α-LA, or β-LG, to the area (or height) of ovine or caprine α-LA or β-LG, have been used to determine the percentage of cow's milk in dairy products [12-15, 37, 38]. Drawbacks of using these ratios for constructing the calibration curves are non-linearity, with increasing slopes as the cow's milk percentage increases, and large confidence limits at high cow's milk contents, where the peak area (or height) ratio tends asymptotically to infinite. The curves are approximately linear up to 20% cow's milk, but the slope increases progressively, being very large over a *ca.* 60% cow's milk. A different approach which overcomes these limitations is proposed in this work. First, binary mixtures of cheeses were prepared and used as standards, for establishing the bovine/caprine and bovine/ovine sensitivity ratios. These were defined, respectively, as:

$$\frac{A_c}{A_g} = f^{\alpha}_{c,g}\frac{C}{G} \qquad (1)$$

$$\frac{A_c}{A_e} = f^{\alpha}_{c,e}\frac{C}{E} \qquad (2)$$

where A_c, A_g and A_e are the areas of the bovine, caprine and ovine α-LA peaks, and C, G and E are the percentages of cow, goat and ewe's milk in binary cheeses, respectively; finally, $f^{\alpha}_{c,g}$ and $f^{\alpha}_{c,e}$ are the sensitivity ratios. For determining the sensitivity ratios for the α-LA and β-LG peaks, two series of binary mixtures, containing from 0 to 70% of cow's cheese and goat or ewe cheese, were prepared and analysed using the two recommended BGEs. Each series contained seven binary mixtures of fresh cheeses and seven binary mixtures of ripened cheeses. As shown in Figures VIII.6 and VIII.7, straight-lines were obtained for the A_c/A_g *versus* C/G and A_c/A_e *versus* C/E plots, thus indicating that $f^{\alpha}_{c,g}$ and $f^{\alpha}_{c,e}$ were independent of the cow's milk contents.

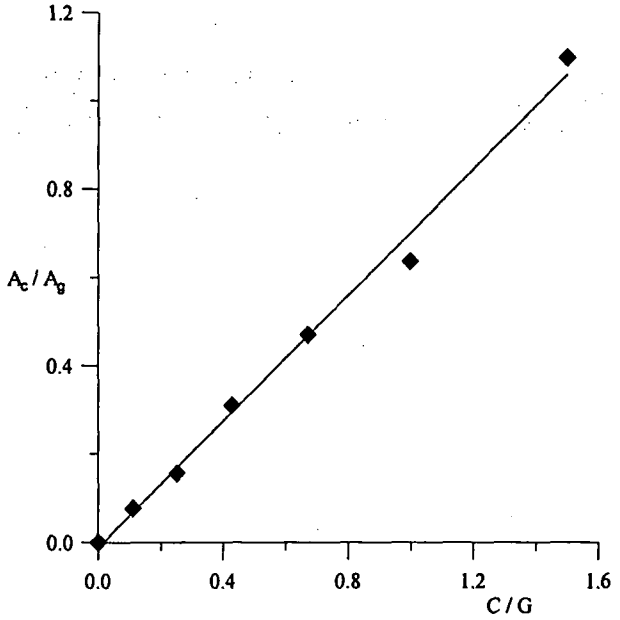


Figure VIII.6. A_c/A_g *versus* C/G for the α-LA peaks of a series of binary mixtures of cow and goat ripened cheeses.

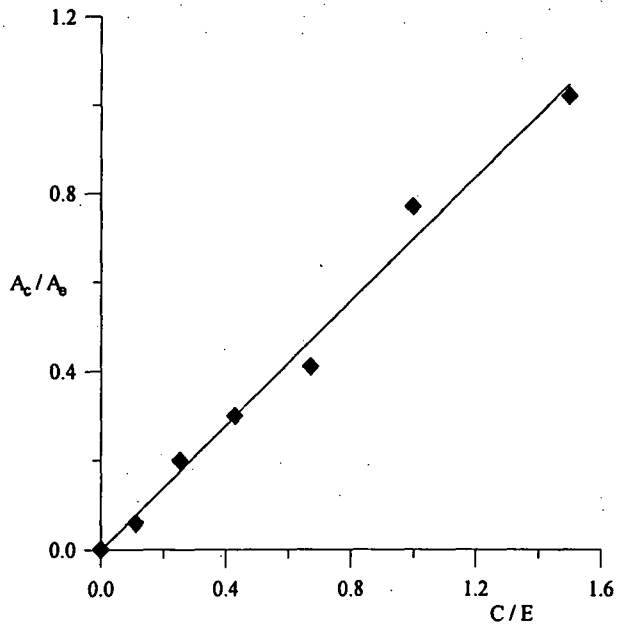


Figure VIII.7. A_c/A_e *versus* C/E for the α-LA peaks of a series of binary mixtures of cow and ewe ripened cheeses.

A linear behaviour was also observed for the $f^{\beta}_{c,g}$ and $f^{\beta}_{c,e}$ sensitivity ratios, which were defined by using expressions analogous to Eqs. (1) and (2), but by utilising the corresponding β-LGs peaks. For the bovine and ovine β-LGs, the sum of the areas of the peaks 2 and 3, and 7 and 8, respectively, were used. Furthermore, in all cases, and within the experimental error range, the points obtained with fresh and ripened cheeses coincided on the same straight-lines. Experimental values of the sensitivity ratios were: $f^{\alpha}_{c,g} = 0.71$, $f^{\alpha}_{c,e} = 0.71$, $f^{\beta}_{c,g} = 1.09$ and $f^{\beta}_{c,e} = 0.82$. The differences from unity could be due to diverse molar absorptivities of the proteins at 214 nm, or maybe also to the various percentages of whey proteins of milk of different animal origin retained by cheese. The linear relationships thus obtained indicated that the A_c/A_g, A_c/A_e and A_g/A_e ratios can be directly used for establishing the composition in binary cheeses. Thus, according to Eqs. (1) and (2), the C/G and C/E ratios of cow-goat and cow-ewe cheeses are given by the A_c/A_g and A_c/A_e peak ratios divided by $f^{\alpha}_{c,g}$ and $f^{\alpha}_{c,e}$, respectively. Furthermore, the G/E ratio in goat-ewe binary cheeses is given by the A_g/A_e ratio divided by $f^{\alpha}_{c,e}/f^{\alpha}_{c,g}$. The same applies to the β-LGs peaks. In order to directly calculate the cow, goat and ewe contents in binary and ternary cheeses using either the α-LA or β-LG peak areas, the following expressions can also be used:

$$C = \frac{A_c}{A_c + f^{a}_{c,g}A_g + f^{a}_{c,e}A_e} 100\% = F_c 100\% \qquad (3)$$

$$G = \frac{A_g}{A_c/f^{a}_{c,g} + A_g + (f^{a}_{c,e}/f^{a}_{c,g})A_e} 100\% = F_g 100\% \qquad (4)$$

$$E = \frac{A_e}{A_c/f^{a}_{c,e} + (f^{a}_{c,g}/f^{a}_{c,e})A_g + A_e} 100\% = F_e 100\% \qquad (5)$$

Eqs. (3), (4) and (5) are easily demonstrated by substituting ($f^{\alpha}_{c,g} A_g$), ($f^{\alpha}_{c,e} A_e$), ($A_c / f^{\alpha}_{c,g}$), [($f^{\alpha}_{c,e} / f^{\alpha}_{c,g}$) A_e], ($A_c / f^{\alpha}_{c,e}$) and [($f^{\alpha}_{c,g} / f^{\alpha}_{c,e}$) A_g] by their values obtained from Eqs. (1) and (2), and reorganising. Eqs. (3), (4) and (5) eliminate the need of constructing calibration curves other than those previously used to evaluate the sensitivity ratios. The equations can also be indistinctly used with binary and ternary cheeses. Furthermore, expressions analogous to Eqs. (3), (4) and (5) can be derived for the β-LG peaks, taking into account that in this case, and for the bovine and ovine β-LGs, the sum of the areas of the peaks 2 and 3, and 7 and 8, respectively, should be used. Sensitivity ratios can change with cheeses of different type, manufactured with a different procedure, or with milk of the same animal species but not of the same breed. For this reason, Eqs. (3), (4) and (5) could lead to small systematic errors when used with tabulated sensitivity ratios. In this case, experiments to establish the sensitivity ratios with cheeses of the same type as the problems to be analysed should be performed.

Alternatively, the standards can be used to plot F_c, F_g and F_e (calculated using the tabulated values of the sensitivity ratios) against C, G and E, respectively. As shown in Figure VIII.8, this gives almost linear or low curvature relationships, with zero intercepts and slopes close to the unity. In case of non-linearity, a least-squares fitting to the quadratic equation ($F_c = a + b\ C + c\ C^2$) gives accurate results. Several series of experimental data were also plotted in Figure VIII.8. As it can be observed, no significant deviations from the predicted linear behaviour were produced. An analogous plot was obtained with β-LGs peaks.

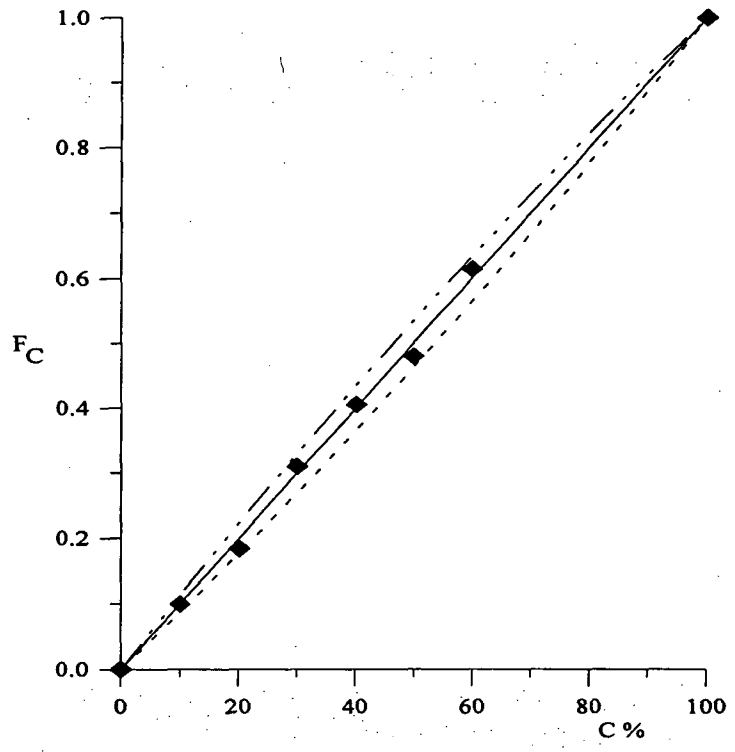


Figure VIII.8. Plot of F_c, calculated as defined in Eq. (3), and using $f^{\alpha}_{c,g} = f^{\alpha}_{c,e} = 0.71$, against C. Slope of the regression straight-line (continuous line), 1.00. Dashed lines obtained by plotting F_c calculated using $f^{\alpha}_{c,g} = f^{\alpha}_{c,e} = 0.60$ (upper line) and $f^{\alpha}_{c,g} = f^{\alpha}_{c,e} = 0.80$ (lower line) for the same C values.

VIII.3.4. Figures of merit

In order to establish the detection limits, two cheese samples containing a 2% cow's milk and 98% goat or ewe's milk, respectively, were analysed eight times per day during 3 days. Ripened cheeses were analysed using BGE (i) at 300 V/cm. The cow contents were calculated using the tabulated sensitivity ratios and Eq. (3). Average intra-day (as the average of the three intra-day values, 7×3 degrees of freedom) and inter-day standard deviations (as total standard deviation, 23 degrees of freedom) were calculated.

According to the IUPAC recommendation [47, 48], the detection limits were calculated as 3.29 times the average intra-day standard deviations of the C values. Using this criterion, at the detection limit the α and β errors are 5%, and the relative standard deviation of C is 30%. The same study was repeated with the same samples but by using BGE (ii) at 450 V/cm. The β-LG peaks and an expression analogous to Eq. (3) were also used. The detection limits given in Table VIII.2 were obtained from the three series of eight determinations, as the average of the corresponding three relative standard deviations of C multiplied by 3.29. The relationship between the standard deviations of the peak areas and the standard deviation of C can also be established theoretically, by using the law of propagation of errors; however, it should be taken into account that the random errors of the peak areas used as input variables in Eq. (3) (as well as in Eqs. (4) and (5)) are strongly correlated. This largely reduces the standard deviation of C in relation to the standard deviations of the peak areas. In other words, the relative standard deviation of the peak areas is much larger than the relative standard deviation of the ratio of peak areas used to calculate C.

Owing to the large standard deviation of the β-LG peaks, this study was also repeated using samples containing 5% cow's milk. The results, also given in Table VIII.2, confirmed the better repeatability and lower detection limits obtained with the α-LA peaks in comparison to those yielded by the β-LG peaks. This can be attributed to the larger errors associated to the quantification of the sum of two peak areas, as occurs with the bovine and ovine β-LGs, in comparison to integration of a single peak area with the α-LAs. Migration time repeatability exhibited a relative standard deviation (RSD) below 2% in all cases. Better peak area and migration time repeatabilities were achieved with fresh cheeses.

Table VIII.2. Detection limits [a] and repeatability for the determination of the cow's milk contents, C, by the proposed procedure.

Peaks measured	Detection limits, C%	Repeatability of peak area (RSD, %)		Repeatability of migration time (RSD, %)	
		Intraday	Interday	Intraday	Interday
α-LA[b]	1.1[b]	0.9	1.5	0.4	0.6
β-LG [b]	2.0[b]	1.2	1.8	0.7	0.9
β-LG [c]	2.1[c]	1.2	1.9	0.7	1.0

[a] As 3.29 times the standard deviation, as recommended by IUPAC [47].

[b] Using a sample with C = 2% and G = 98%, and another sample with C = 2% and E = 98%, to estimate the standard deviation in the vicinity of the detection limit.

[c] The same as above, but with C = 5%.

VIII.3.5. Analysis of samples

The recommended procedures were used for analysing the commercial cheese samples indicated in Table VIII.1. Cow's milk should not be present in pure goat and ewe cheeses, and the adulteration of supposedly pure and mixed cheeses with cow's milk is economically significant when the actual cow's milk contents surpasses the declared value by 10% or more. As shown in Table VIII.1, both the detection of a few parts per cent of cow's milk in pure goat and ewe cheeses, and a cow's milk excess larger than 10% in the declared composition of a binary or ternary cheese, can be addressed by the proposed CZE method.

The results (columns 3 and 4) coincided with the declared composition and with the SDS-PAGE data, as given by the manufacturers, within the experimental error. Notice, however, that the values found by integration of the β-LG peaks are consistently 5-8% lower than those obtained upon α-LA quantitation, and also exhibit larger standard deviations. As indicated above, this later can be explained by the larger random error associated to the quantification of the sum of two peak areas in comparison to the integration of a single peak area. On the other hand, a systematic error can only be produced by factors affecting the samples showed in Table VIII.2, but not the standards used to obtain the sensitivity ratios, or to construct the calibration curves. As indicated above, the standards were prepared by mixing cheeses of a single animal origin, whereas the different milks used to elaborate the samples were mixed at the beginning of the cheese manufacture process. Maybe due to the easier denaturation of the bovine β-LGs, to water solubility differences, or for any other unknown reason affecting the manufacture process, the use of the β-LG peaks lead to a slight underestimation of the cow contents.

VIII.4. Conclusions

A quick and simple capillary electrophoresis procedure for the separation and quantitation of the bovine, caprine and ovine α-LA and β-LG peaks in binary and ternary cheeses has been developed. With the β-LG peaks, the bovine and ovine A and B genetic variants can also be distinguished as individual peaks (see Figs. VIII.4 and VIII.5). In the proposed procedure, separation is performed in a very short time, thus for instance, the separation of α-LAs is completed in 11 min, and the between-sample rinsing time can be reduced to 2 min or less. This is significantly less than the 30 min which are required in the chromatographic procedures described in the literature. A calibration approach, which is simpler and gives a better precision and accuracy than the procedures used in the literature, has also been described. The present procedures give lower detection limits, are cheaper and more rapid than any other protocol reported in the literature, and can be easily applied to the routine quality control of binary and ternary cheeses. An additional, non-negligible advantage, is that our protocol does not require coated capillaries, as necessary in methods adopting alkaline buffers, thus substantially reducing analysis costs. Due to the low operative pH, the effective suppression of silanol ionization not only prevents protein binding to the wall, but also minimizes the electroendoosmotic flow, with markedly improved run reproducibility.

VIII.5. References

1. W. Richter, I. Krause, C. Graf, I. Sperrer, C. Schwarzer and H. Klostermeyer, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 204 (1997) 21.
2. M. Beer, I. Krause, M. Stapf, C. Schwarzer and H. Klostermeyer, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 203 (1996) 21.
3. F. Addeo, L. Moio, L. Chianese and A. Di Luccia, Ital. J. Food Sci., 1 (1989) 45.
4. L. Amigo, G. Santa-Maria, D. Gonzalez de Llano and M. Ramos, XXII Int. Dairy Congress, The Hague, 202 (1986) 175.
5. L. Amigo, I. Ibañez, C. Fernandez, G. Santa-Maria and M. Ramos, Milchwissenschaft, 44 (1989) 215.
6. L. Moio, M.L. Sasso, L. Chianese and F. Addeo, Ital. J. Food Sci., 2 (1990) 185.
7. I. Krause, I. Berner and H. Klostermeyer, in B.J. Radola, Ed., Electrophoresis Forum, Bode, Munich, 1989, p. 383.
8. E. Molina, M. Ramos and P. Martin-Alvarez, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 201 (1995) 331.
9. M. Ramos and M. Juarez, Int. Dairy Fed. Bull., 202 (1986) 175.
10. M. De Frutos, A. Cifuentes, L. Amigo, M. Ramos and J.C. Diez-Masa, Z. Lebensm.Unters. Forsch., 195 (1992) 326.
11. W. Urbanke, W. Luf and E. Brandl, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 195 (1992) 137.
12. P. Resmini, L. Pellegrino, R. Andreani and F. Prati, Sci. Tec. Latt.-Cas., 40 (1989) 7.
13. L. Pellegrino, I. De Noni, A. Tirelli and P. Resmini, Sci. Tec. Latt.-Cas., 42 (1991) 87.
14. L. Pellegrino, A. Tirelli and F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 43 (1992) 297.
15. I. De Noni, A. Tirelli and F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 47 (1996) 7.
16. I. Recio, L. Amigo and R. Lopez-Fandiño, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 231.
17. J. Otte, K.R. Kristiansen, M. Zakora and K.B. Qvist, Neth. Milk Dairy J., 48 (1994) 81.
18. J. Otte, L. Midtgaard and K.B. Qvist, Milchwissenschaft, 50 (1994) 75.
19. I. Recio, E. Molina, M. Ramos and M. De Frutos, Electrophoresis, 16 (1995) 654.

20. M. De Frutos, E. Molina and L. Amigo, Milchwissenschaft, 51 (1996) 374.
21. I. Recio, M. De Frutos, A. Olano and M. Ramos, J. Agric. Food Chem., 44 (1996) 3955.
22. G.R. Paterson, D.E. Otter and J.P. Hill, J. Dairy Sci., 78 (1995) 2637.
23. G.R. Paterson, J.P. Hill and D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 105.
24. N.M. Kinghorn, G.R. Paterson and D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 371.
25. M. Strickland, B.C. Weimer and J.R. Broadbent, J. Chromatogr. A, 731 (1996) 305.
26. I. Recio, M.L. Perez-Rodriguez, M. Ramos and L. Amigo, J. Chromatogr. A, 768 (1997) 47.
27. J.F. Fairise and P. Cayot, J. Agric. Food. Chem., 46 (1998) 2628.
28. N. De Jong, S. Visser and C. Olieman, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 207.
29. A. Cifuentes, M. De Frutos and J.C. Diez-Masa, J. Dairy Sci., 76 (1993) 1870.
30. M. Kanning, M. Casella and C. Olieman, LC-GC Int., 6 (1993) 701.
31. J. Van Riel and C. Olieman, Electrophoresis, 16 (1995) 529.
32. N.M. Kinghorn, C.S. Norris, G.R. Paterson and D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 111.
33. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro, P.M. Toppino and V. Denti, J. Chromatogr. A, 721 (1996) 345.
34. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro and G.F. Greppi, Milchwissenschaft, 51 (1996) 616.
35. I. Recio and C. Olieman, Electrophoresis, 17 (1996) 1228.
36. B. Vallejo-Cordoba, J. Cap. Electrophor., 4 (1997) 219.
37. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska and M. Masci, Ital. J. Food Sci., 10 (1998) 317.
38. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska and M. Masci, J. Chromatogr. A, 846 (1999) 135.
39. A.V. Stoyanov and P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 790 (1997) 169.
40. P.G. Righetti and F. Nembri, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 203.
41. A. Bossi and P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 2012.
42. C. Gelfi, M. Perego and P.G. Righetti, Electrophoresis, 17 (1996) 1470.
43. A.V. Stoyanov, C. Gelfi and P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 717.

44. L. Capelli, F. Forlani, F. Perini, N. Guerrieri, P. Cerletti and P.G. Righetti, Electrophoresis, 19 (1998) 311.

45. E. Olivieri, A. Viotti, M. Lauria, E. Simò-Alfonso and P.G. Righetti, Electrophoresis, 20 (1999) 1595.

46. R.J. Xu, C. Vidal-Madjar and B. Sebille, J. Chromatogr. B, 706 (1998) 3.

47. L.A. Currie, Pure Appl. Chem., 67 (1995) 1699.

48. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeke, in: Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997, p. 426.

PARTE C

CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS EN PRODUCTOS INDUSTRIALES

IX. CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS

CAPÍTULO IX

CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS

IX.1. Tensioactivos

IX.1.1. Definición

Los tensioactivos son compuestos que se concentran o acumulan en la interfase entre dos medios, alterando la tensión superficial. El uso de tensioactivos se inició con el desarrollo del jabón en las culturas Sumeria [1] y Egipcia alrededor del 7000 a. C. [2]. Con el paso del tiempo, la preparación del jabón se fue perfeccionando en función de las demandas de higiene y limpieza. En la primera mitad del siglo XIX, se descubrieron nuevas sustancias capaces de modificar la tensión superficial.

Sin embargo, hasta hace poco no se prestaba atención a los problemas ambientales y toxicológicos relacionados con el uso de tensioactivos. Hoy en día, la dilución de los vertidos y su biodegradabilidad en agua son muy importantes, tanto para mantener en valores mínimos el nivel de contaminantes en ríos, lagos y costas, como para asegurar el funcionamiento correcto de las instalaciones de depuración de aguas residuales.

Los tensioactivos poseen una constitución molecular típica, esencialmente lineal y asimétrica, con un resto hidrófobo y un grupo hidrófilo. La parte hidrofóbica es una cadena alifática, lineal o ramificada, conteniendo en general entre 10 y 18 carbonos. En los productos naturales y en los de transformación química (alcoholes grasos, amidas, aminas alifáticas) predominan las cadenas no ramificadas, mientras que en los derivados del petróleo y los obtenidos por síntesis (usualmente a partir del carbón) existen multitud de cadenas ramificadas. Por su parte el resto hidrofílico, determinante de la solubilidad en agua, es un grupo polar de carácter ácido tal como un grupo sulfato, sulfonato o

carboxilato, o de carácter básico como una amina, una sal de amonio cuaternario o el ion piridinio.

Los tensioactivos presentan una estructura anfifílica que se manifiesta en la afinidad de cada resto hacia una fase de distinta polaridad, y en la concentración del tensioactivo en la superficie del líquido, disminuyendo la tensión superficial del mismo. Por ello, presentan propiedades tales como la formación de emulsiones, mojabilidad, dispersión, detergencia y/o solubilización. Los tensioactivos ya sean naturales o sintéticos, cambian la solubilidad y el estado de otros constituyentes presentes en el medio, y lo organizan formando micelas y otras microestructuras.

Sobre las propiedades tensioactivas de un compuesto influye, además de la propia naturaleza del grupo hidrofílico, la situación que éste ocupa en la molécula. En principio se pueden distinguir:

a) *Posición terminal.* La estructura molecular es polar y totalmente asimétrica. El grupo hidrofílico puede estar unido directamente al hidrofóbico, o entre ambos puede existir un resto de carácter alifático o aromático que posea ya cierto carácter hidrofílico. Si la cadena hidrofóbica tiene una longitud adecuada, estas estructuras muestran básicamente carácter detergente.

b) *Posición central.* El grupo hidrofílico se intercala en cualquier punto de la cadena hidrofóbica, aunque si en ella existen puntos reactivos (enlaces dobles, grupos hidroxilo, etc.) tiende a ocupar esos lugares. De todas formas, conforme el grupo hidrofílico está más centrado en la cadena, tanto más se ve mermada la capacidad detergente del tensioactivo.

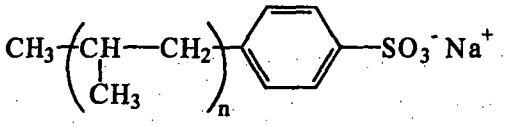
c) *Varios grupos hidrofílicos.* En una cadena pueden estar presentes varios grupos hidrofílicos, lo que exalta notablemente la solubilidad del tensioactivo en agua, pero reduciendo su capacidad detergente. Tal estructura comunica sin embargo propiedades dispersantes al tensioactivo.

IX.1.2. Clasificación

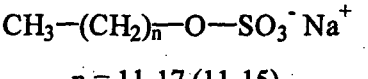
Atendiendo a su carga, los tensioactivos se clasifican en aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfóteros. Los aniónicos tienen el grupo hidrofílico de carácter ácido y, junto con el resto hidrófobo, forman un anión. Los catiónicos son los que tienen el grupo hidrofílico de carácter básico. Si el grupo hidrófilo no es capaz de ionizarse y formar sales, el tensioactivo se califica de no iónico, como es el caso de varios grupos éter espaciados a lo largo de una cadena alifática. Finalmente las moléculas que tienen simultáneamente restos ácidos y básicos son tensioactivos anfóteros o iones dobles.

a) Tensioactivos aniónicos

Los tensioactivos aniónicos se caracterizan por tener un grupo hidrofílico cargado negativamente. El más antiguo y conocido es el jabón que, si bien es un tensioactivo aniónico, se acostumbra a incluir en una categoría separada de los restantes, a los que se les conoce en su conjunto como detergentes sintéticos. Suelen distinguirse los siguientes grupos: alquilbenceno sulfonatos ramificados (ABS, *branched alkylbenzenesulfonates*), alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS, *linear alkylbenzenesulfonates*), alquil sulfatos (AS, *alkyl sulfates*), alquil sulfatos etoxilados (AEOS o LES, *alkyl or lauryl ether sulfates*) alquil fenol éter sulfatos (FAES, *fatty alcohols ether sulfates*), α-olefina sulfatos (AOS, *α-olefin sulfates*), alquil sulfonatos, α-sulfonatos de ácidos grasos y ésteres, mono- y diésteres sulfosuccinatos y sulfonatos derivados del petróleo (Figura IX.1).

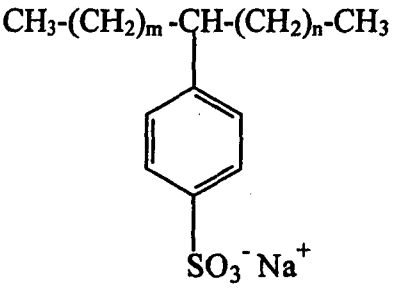


Alquilbenceno sulfonatos ramificados (ABS)

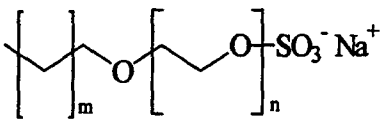


n = 11-17 (11-15)

Alquil sulfatos (AS)



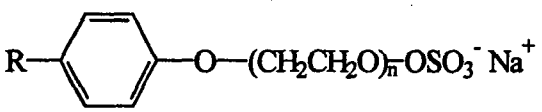
m + n= 7-11



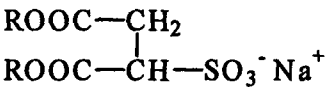
m = 11-14 n = 1-16 (2-3)

Alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS)

Alquil sulfatos etoxilados (AEOS)

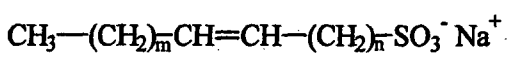


n = 3 (1-8) R: cadena alquílica

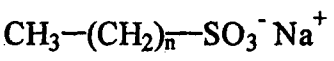


Alquilfenol éter sulfatos (FAES)

Alquil sulfosuccinatos



m + n = 9-15



n = 12-18

α-Olefin sulfonatos (AOS)

Alquil sulfonatos

Figura IX.1. Estructura y nomenclatura de los principales tipos de tensioactivos aniónicos.

En la actualidad, los detergentes sintéticos aniónicos más importantes son los LAS, presentes en productos comerciales como una mezcla compleja compuesta de homólogos, principalmente C_{10}-C_{14}, e isómeros posicionales (Figura IX.1). La principal ventaja de éstos con relación a otros detergentes aniónicos es su biodegradabilidad, pues los microorganismos sólo son capaces de metabolizar cadenas lineales. Sin embargo, hay que indicar que los LAS pueden llegar a ser venenosos para los peces y otros organismos si su cadena alquílica es superior a 14 átomos de carbono. Al aumentar la hidrofobicidad de la cadena alquílica, aumenta también su retención en las grasas, y por tanto en los tejidos animales y vegetales. Por todo ello, los alquilbenceno sulfonatos han sufrido varios cambios en su formulación desde mediados de los años sesenta. Se usan principalmente en detergentes y agentes de limpieza. Tras su uso, son vertidos al agua, por lo que es de interés su determinación en aguas, lodos de depuradora y otras muestras ambientales.

b) Tensioactivos catiónicos

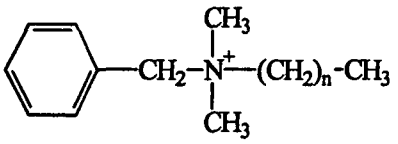
Tienen un grupo hidrofílico cargado positivamente. Suelen agruparse en ácidos grasos de amida, amidoaminas, imidazolinas, derivados del petróleo, nitrilos, cíclicos alifáticos, aromáticos, compuestos no nitrogenados, poliméricos catiónicos y óxidos de amina.

Los tensioactivos catiónicos de importancia industrial [3] son compuestos grasos nitrogenados y, especialmente, compuestos con nitrógeno cuaternario (Figura IX.2). Son de poca utilidad en procesos de limpieza, porque la mayoría de las superficies tienen carga negativa y los cationes se retienen sobre ellas en lugar de solubilizar la suciedad adherida. Sin embargo, y debido a estas mismas propiedades, poseen numerosas aplicaciones especializadas. Por ejemplo, las aminas y los compuestos cuaternarios inhiben el crecimiento de organismos monocelulares como bacterias y algas. Las moléculas se orientan en la interfase entre la membrana bacteriana y el agua o el aire, creando una película cerrada de dimensión molecular que interfiere en la respiración del organismo y

éste muere. Por este motivo son antisépticos y bactericidas, utilizándose en pastillas para infecciones bucofaríngeas y en aerosoles nasales [4].

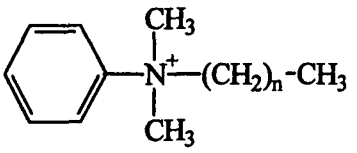
Además las aminas grasas primarias y las aminopropilaminas grasas se utilizan como inhibidores de la corrosión, y en la limpieza de metales, cuando se utiliza HCl para disolver el óxido. La amina se orienta en la interfase entre el metal y la solución ácida, con las colas hidrofóbicas comprimidas, formando una capa protectora de una o dos moléculas de espesor. Esta capa es tan cerrada que evita el ataque del metal limpio por parte del exceso de ácido.

Otra aplicación más de los compuestos grasos nitrogenados, y que depende de la actividad de superficie y orientación, es el suavizado de textiles. El tensioactivo catiónico se adsorbe y orienta en la interfase formada entre el textil y el agua. También, tienen afinidad por la superficie del cabello, utilizándose como acondicionadores y suavizantes en productos que se aplican después del lavado, para contrarrestar así el efecto apelmazante de los tensioactivos aniónicos.

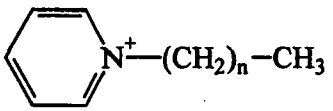


n = 7-17 (11, 13)

Sales de alquilbencildimetil amonio

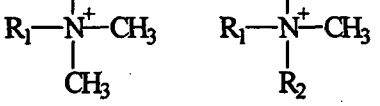


Sales de alquilbencendimetil amonio



n = 12-14

Sales de alquil piridinio



$R_1, R_2 = C_nH_{2n+1}$ n = 12-18

Sales de alquiltrimetil- y dialquiltrimetil amonio

Figura IX.2. Estructura y nomenclatura de los principales tipos de tensioactivos catiónicos.

c) Tensioactivos no iónicos

En los tensioactivos no iónicos la parte hidrofílica de la molécula es una cadena de polioxietileno, cuyos grupos éter comunican la polaridad necesaria para garantizar su solubilidad en agua por formación de puentes de hidrógeno. Si bien la cadena polioxietilénica no es tan polar como un grupo ionizado, un conjunto de 5 ó 10 unidades de óxido de etileno (EO, *ethylene oxide*) puede alcanzar una notable capacidad hidrofílica.

Son excelentes agentes humectantes, compatibles tanto con tensioactivos aniónicos como catiónicos, y no se ven afectados por los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} del agua dura. Desafortunadamente, tienden a ser líquidos o ceras de bajo punto de fusión y, por consiguiente, es difícil formularlos en forma de polvo. Así por ejemplo, los detergentes en polvo de baja espuma, que han tenido cierto éxito en lavadoras automáticas, son pegajosos al tacto. A cambio, los tensioactivos no iónicos son ideales para formulaciones en estado líquido. Otro de sus inconvenientes es su tendencia precipitar a temperaturas elevadas o fuerzas iónicas altas, debido a la menor solvatación de la cadena de polioxietileno.

Los tensioactivos no iónicos más importantes son los etoxilados, los cuales se producen por condensación de óxido de etileno con alquilfenoles o alcoholes. Esta condensación da lugar a una cierta distribución de homólogos con distinto número de unidades de EO (Figura IX.3).

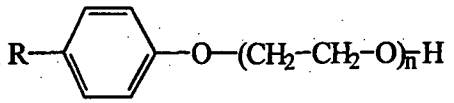
Los alcoholes etoxilados (AEs, *alcohols ethoxylated*) son los tensioactivos no iónicos más empleados en productos de limpieza, cosméticos, herbicidas, etc., debido a su fácil eliminación mediante tratamiento biológico de las aguas residuales. Estos tensioactivos son mezclas de homólogos, tanto en la longitud de la cadena alquílica (que suele variar de 8 a 18 átomos de carbono), como en el número de unidades de EO. Los alquilfenol etoxilados (APEs, *alkylphenols ethoxylated*), principalmente octifenoles (OPEs, *octylphenols ethoxylated*) y nonilfenoles (NPEs, *nonylphenols ethoxylated*), también poseen una cadena de unidades de EO, pero a diferencia de los AEs, absorben en el UV. La aplicación de los APEs en detergentes está restringida, debido a la difícil

eliminación biológica (escasa biodegradabilidad) de los metabolitos más hidrofóbicos, concretamente, los alquifenoles no etoxilados y monoetoxilados. No obstante, siguen siendo empleados en industrias textiles y de colorantes.

Los AEs lineales se biodegradan más rápidamente que los APEs. Además, tienen mejores propiedades de detergencia que los LAS sobre muchos tipos de suciedad y sobre la mayoría de las telas, y son especialmente buenos para eliminar la grasa de las fibras sintéticas. También trabajan bien en frío, y se espera que sean los de mayor desarrollo entre los principales componentes de los detergentes domésticos.

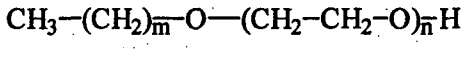
También se conocen derivados de aminas, amidas (alcanolamidas, FAA, *fatty alkanol amides*) y ésteres de ácidos grasos, siendo bastante empleados en productos de aseo corporal. Así por ejemplo, la dietanolamida de coco posee buenas propiedades espumantes, estabilizando la espuma de los tensioactivos aniónicos.

Finalmente, los tensioactivos no iónicos a base de azúcares (alquilpoliglucósidos, APG, *alkylpolyglucosides*) tienen una biodegradabilidad sumamente rápida y baja toxicidad, y pueden elaborarse a partir de materias primas naturales. Por ello, aunque han tenido poco impacto, puede aumentar su importancia en el futuro.



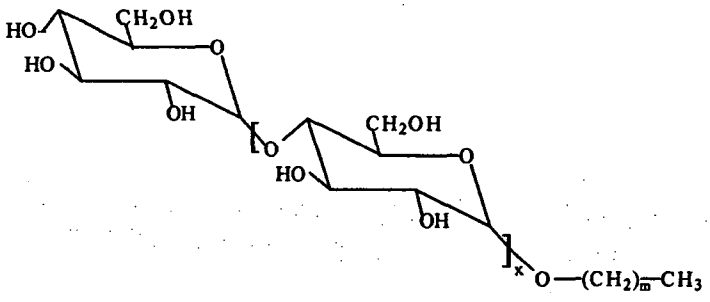
n = 2-100 (9-10)
R = C_9H_{19} (nonil) C_8H_{17} (octil)

Alquilfenol etoxilados (APE)



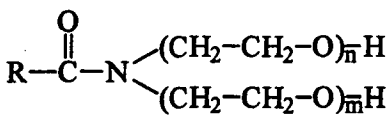
m = 7-8 n = 2-10

Alcoholes etoxilados (AE)



m = 7-17 (7, 9, 11)
x = 1-3 (1.2-1.6)

Alquilpoliglucósidos (APG)



R: cadena alquílica (C_{11}-C_{17})
n = 1, 2 m = 0, 1

Alcanolamidas (FAA)

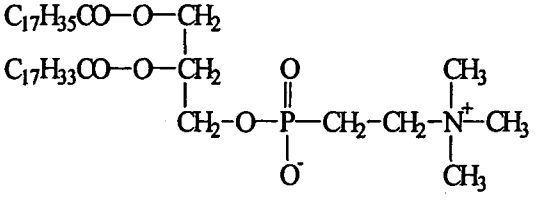
Figura IX.3. Estructura y nomenclatura de los principales tipos de tensioactivos no iónicos.

d) Tensioactivos anfóteros

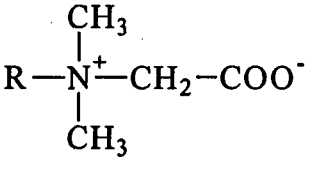
Son compuestos con estructura de ion doble, esto es, presentan simultáneamente una carga positiva y otra negativa sobre la misma molécula. Pueden comportarse como aniónicos o como catiónicos, dependiendo del pH de la disolución en la que se utilicen. Además, tienen una cadena alquílica lineal saturada con un número variable de átomos de carbono, entre 12 y 18.

A pH cercanos a 7 son menos irritantes que los catiónicos y aniónicos, y se utilizan en champús suaves. La formulación de estos productos es complicada por la posible precipitación del tensioactivo anfótero cuando el pH está próximo a su punto isoeléctrico. Pueden utilizarse, junto con NaOH, en limpiadores alcalinos para superficies grasas, y como limpiadores ácidos junto con HCl para superficies oxidadas, debido a que son estables y funcionales en un amplio intervalo de pH.

Un número importante de compuestos naturales ampliamente conocidos, como por ejemplo la lecitina, son tensioactivos anfóteros. Una clase adicional de tensioactivos anfóteros que presentan un grupo amonio cuaternario son las alquilbetaínas (Figura IX.4).



Lecitina



R: cadena alquílica (C_{12}-C_{16})

Alquilbetaínas

Figura IX.4. Estructura y nomenclatura de los principales tipos de tensioactivos anfóteros.

IX.1.3 Composición de productos industriales de limpieza

En la composición química de productos industriales de limpieza y detergentes, además de la presencia de tensioactivos, que suelen constituir la materia activa de la formulación, nos encontramos con otros componentes básicos. No todas las formulaciones los llevan, y su composición puede diferir en función del uso industrial o cosmético del producto.

a) Coadyuvantes o fortificadores

Generalmente son sales inorgánicas que mejoran o protegen la eficacia detergente del tensioactivo. El más utilizado de todos ellos es el tripolifosfato sódico (STPP, *sodium tripolyphosphate*). Sus funciones incluyen:

- Ablandar el agua de lavado. Los mecanismos de actuación incluyen precipitación (carbonato sódico), secuestro (fosfatos, EDTA, ácido nitrilotriacético y citrato sódico) e intercambio iónico (zeolitas y ácidos policarboxílicos solubles en agua).

- Actuar como emulsionante de la grasa y partículas sólidas de la suciedad impidiendo su redeposición.

- Proporcionar la alcalinidad adecuada para el lavado (STPP, zeolitas, carbonato sódico).

Los silicatos sódicos (SiO_2/Na_2O en diferentes relaciones) actúan como coadyuvantes a altas concentraciones. A bajas concentraciones se comportan como inhibidores de la corrosión, formando una película protectora sobre las superficies metálicas de las máquinas de lavado. Asimismo, en el lavado automático de vajillas protegen el color y esmalte de las cerámicas (inhiben la solubilización de sílice y silicatos por efecto de ion común).

b) Blanqueantes oxidantes

Su función es eliminar las manchas persistentes. Los principales son el perborato sódico y el percarbonato sódico. Su modo de actuación conlleva su descomposición en agua, liberando peróxido de hidrógeno, cuyo poderoso poder oxidante es el causante de la eliminación de las manchas.

c) Blanqueantes ópticos

Son compuestos fluorescentes generalmente derivados del triazimilestibeno sulfonado. Se utilizan en formulaciones para el lavado de tejidos. Actúan absorbiendo la radiación UV, emitiendo parte de la energía absorbida en forma de luz visible correspondiente a la parte azul del espectro, enmascarando de esta forma el tono amarillento típico de los tejidos usados o mal lavados. Proporcionan un brillo y blancura aparente.

d) Estabilizantes de los blanqueantes

Con este fin se utilizan EDTA y fosfonatos, tales como los del ácido nitrilotrimetilenfosfónico. Secuestran los metales pesados que pueden estar presentes en las aguas de lavado, y que provocan la descomposición prematura del blanqueante.

e) Agentes de antirredeposición

Impiden que la suciedad separada de los tejidos durante el lavado se redeposite sobre los mismos. Se adsorben sobre los tejidos repeliendo, gracias a su carga eléctrica negativa, la suciedad presente en la disolución. El más común es la carboximetilcelulosa sódica, que sólo es efectiva con tejidos de algodón. La generalización de las fibras sintéticas ha exigido la búsqueda de productos alternativos, tales como los éteres de celulosa no iónicos. Las formulaciones comerciales llevan mezclas de ambos compuestos.

f) Enzimas

Catalizan la descomposición de proteínas de alto peso molecular en fracciones de bajo peso molecular, más fácilmente eliminables de las superficies a lavar. Se utilizan mezclas de enzimas, puesto que son específicas con respecto a cada tipo de suciedad. Las más usadas son las proteasas y las lipasas. Las primeras actúan sobre la suciedad proteica y manchas de huevo, grasa y sangre. Las segundas actúan sobre manchas de grasas de alto peso molecular.

g) Controladores de espuma

Pueden potenciar o disminuir la formación de espuma. En máquinas de lavado automático se busca reducir la espuma, lo que se consigue mediante la adición de una pequeña cantidad de jabón. En formulaciones para el lavado de la vajilla a mano es deseable el aumento del efecto espumante, para lo que se usan alcanolamidas de ácidos grasos, amidas de ácidos grasos, betaínas, sulfobetaínas y óxidos de amina.

h) Suavizantes

En los últimos años se han desarrollado formulaciones para el lavado de tejidos que incorporan agentes suavizantes, tales como cloruros de dialquildimetilamonio y sales de imidazolinio.

i) Perfumes y colorantes.

Se emplean para proporcionar unas características más agradables a la formulación.

j) Cargas

Las cargas son generalmente sales inorgánicas, sobre todo sulfato sódico, que se utilizan en formulaciones de detergentes en polvo, para ajustar el nivel de ingredientes activos por dosis recomendada, evitar el apelmazamiento de las partículas de detergente, mejorar sus propiedades de escurrido, controlar su densidad y evitar la formación de polvo. En los últimos años su uso está disminuyendo, como consecuencia de la aparición de las formulaciones en polvo concentradas.

k) Auxiliares de formulación

Los auxiliares de formulación son compuestos que se emplean en detergentes líquidos. Son agentes hidrótropos, cuya función es aumentar la solubilidad y miscibilidad de todos los componentes de la formulación en el agua, favoreciendo su compatibilidad. Los más utilizados son las sales sódicas de p-toluen- , xilen- y cumen-sulfonatos, así como la urea, el etanol y el isopropanol. Los alcoholes permiten además reducir la viscosidad de la formulación.

IX.2. Análisis de tensioactivos

IX.2.1. Precauciones en la toma y preparación de la muestra

El principal problema de preparación y tratamiento de muestras con baja concentración de tensioactivos, es su tendencia a adsorberse sobre las interfases, lo que resulta especialmente problemático en matrices tales como lodos de depuradora, suelos o sedimentos. Además, para evitar la pérdida de tensioactivos, la toma de muestra debe realizarse en condiciones de baja o nula formación de espuma.

La adsorción de tensioactivos puede tener lugar también sobre las paredes de botellas, pipetas y material de vidrio, causando contaminación cruzada. Para evitarla es

recomendable lavar los recipientes con metanol. Weber y Morris [5] observaron que una disolución 0.01 M de KH_2PO_4 desorbe los tensioactivos aniónicos de las superficies de vidrio. Marcomini y col. [6] encontraron que la adición de un 3% de NaCl a las disoluciones reduce e incluso elimina las pérdidas de LAS adsorbido sobre material de vidrio.

Las muestras ambientales deben de ser tratadas inmediatamente, con el fin de minimizar y prevenir la degradación microbiana. Para evitarla, las muestras de agua y lodos de depuradora son conservadas con un 1% de formaldehído y guardadas a 4°C en la oscuridad [7-9], mientras que las muestras de sedimentos son congeladas a -20°C para su posterior análisis [10-11].

IX.2.2. Extracción y preconcentración

La elección de la técnica de extracción más adecuada para la recuperación de tensioactivos debe tener en cuenta la sensibilidad y selectividad del método analítico que se va a utilizar, la complejidad de la muestra, y las características químicas y físicas de los analitos.

La extracción de una disolución acuosa con un disolvente inmiscible ofrece, en un solo paso, tanto una prepurificación como una preconcentración. La selectividad se alcanza eligiendo un disolvente adecuado, y ajustando las condiciones experimentales de la fase acuosa. Sin embargo, en la extracción líquido-líquido, la tendencia del tensioactivo a concentrarse en las interfases conduce a la formación de emulsiones, lo que dificulta una completa separación. Otro inconveniente es que los tensioactivos no tienen preferencia por la fase orgánica. Los tensioactivos iónicos se extraen mediante formación de pares iónicos con contraiones adecuados [8, 12, 13]. Sin embargo, los tensioactivos iónicos de larga longitud de cadena tienden a formar emulsiones, y por ello, la extracción de pares iónicos da lugar a recuperaciones altas tan sólo cuando la cadena carbonada es corta [7, 14].

Los procedimientos de extracción en fase sólida permiten el aislamiento de los compuestos de interés de forma rápida y sencilla. En general, se utilizan resinas

hidrofóbicas y de intercambio iónico, cuya naturaleza es afín a la mayoría de los tensioactivos. Se han extraído y enriquecido LAS con diferentes fases estacionarias inversas [15-17] y posterior intercambio aniónico [18]. También, se han preconcentrado AEOS y AS mediante fases estacionarias tipo C2 [19]. El aislamiento de APEs de muestras acuosas se ha realizado con cartuchos C18 [20] tras intercambio iónico previo sobre resinas Amberlite XAD [21] y carbón activo [22]. La preconcentración de AE y APG se ha realizado en fase inversa con columnas C8 y C18 [23, 24].

La extracción con fluidos supercríticos [25-28] presenta un gran número de ventajas en comparación con el uso de extractantes líquidos. Es más rápida, y las recuperaciones son mayores, reduciéndose la cantidad de disolvente empleado, y siendo más fácil interconectar el paso de extracción con la cromatografía de gases y la cromatografía de fluidos supercríticos [26-28].

Para extraer tensioactivos de lodos, sedimentos y suelos se han utilizado la extracción Soxhlet y la destilación. Así por ejemplo, el LAS se aísla de lodos de depuradora por extracción Soxhlet [29], y el APE se separa mediante destilación con disolventes [7, 10, 29-31], a veces seguida de extracción líquido-líquido [7, 31].

IX.2.3. Técnicas de medida

IX.2.3.1. Volumetría

El análisis de tensioactivos, bien sea mediante volumetría o colorimetría, se basa generalmente en reacciones características de los grupos polares, tales como carboxilato, sulfato, sulfonato, hidroxilo o sal de amonio cuaternario [32-35]. Estos métodos proporcionan el contenido total de un determinado tipo de tensioactivos, pero no los caracterizan. A su vez, poseen muchas interferencias, y no aportan información sobre homólogos e isómeros.

El contenido de materia activa aniónica se suele realizar mediante valoración indirecta en dos fases, utilizando un tensioactivo catiónico como valorante (cloruro de bezetonio, *Hyamin 1622*, o bromuro de hexadeciltrimetil amonio, CTAB) y en presencia de azul de metileno o de bromofenol como indicador [33, 35].

Análogamente, el contenido en tensioactivos catiónicos se determina mediante valoración o colorimetría con un tensioactivo aniónico. Otro método ampliamente empleado es la valoración en dos fases con tetrafenilborato sódico, utilizando azul de bromofenol o naranja de metilo como indicadores. La ventaja de este método es la posibilidad de diferenciar distintos grupos de tensioactivos catiónicos controlando el pH de la valoración.

El contenido total de tensioactivos no iónicos polietoxilados se suele determinar mediante precipitación previa con tetraiodobismutato bárico, seguida de redisolución con tartrato amónico. El bismuto presente en la disolución es entonces valorado con EDTA, empleando naranja de xilenol como indicador. Los tensioactivos no iónicos determinados por este método son denominados sustancias activas al bismuto o BiAS (*bismuth active substances*). Otro método menos usado para este tipo de tensioactivos es la valoración en dos fases con tetrakis-(4-clorofenol) borato potásico [36, 37].

IX.2.3.2. Colorimetría

Los procedimientos colorimétricos tienen como base analítica común la formación de un compuesto coloreado que se pueda extraer con un disolvente inmiscible [38-41].

La extracción con azul de metileno seguida de colorimetría supone un método relativamente sensible, sencillo y rápido para la determinación de tensioactivos aniónicos. El par iónico azul de metileno /tensioactivo aniónico es más soluble en líquidos orgánicos que en agua. La intensidad del color azul es una medida de la cantidad total de tensioactivo aniónico [42-43]. Una gran cantidad de tensioactivos aniónicos sintéticos se pueden determinar mediante este procedimiento: ABS, LAS, AS y AEOS. El límite de

detección del método está próximo a 25 μg ml^{-1}. Los tensioactivos aniónicos determinados con este método son denominados sustancias activas al azul de metileno o MBAS (*methylene blue active substances*). En lugar de azul de metileno, también se han empleado otros colorantes del tipo azo piridinio [44], y derivados de trifenilmetano [45-47].

Para tensioactivos catiónicos, se suele emplear el colorante aniónico azul de disulfina, basándose el método en la formación y extracción del par iónico formado entre el colorante y el tensioactivo [42, 48, 49]. Los tensioactivos catiónicos determinados usando este método se denominan sustancias activas al azul de disulfina o DBAS (*disulfine blue active substances*).

Para extraer tensioactivos no iónicos polialquiletoxilados se utiliza tetratiocianato de cobalto(II). El grupo polialquiletoxilado hidrofílico compleja al cobalto, dando lugar a un catión de gran tamaño que forma una par iónico con el anión tiocianocobaltato(II) [50, 51]: [$R(OCH_2CH_2)_nOHCo^{2+}$, $Co(SCN)_4^{2-}$]. El límite de detección es de 1 μg ml^{-1}.

También se puede emplear el método BiAS, pero en lugar de efectuar la valoración con EDTA, se hace reaccionar el bismuto con ditiocarbamato de pirrolidina, con la subsiguiente formación de un complejo entre ambos, que absorbe a 405 nm.

IX.2.3.3. Otras técnicas espectroscópicas

a) Espectroscopia ultravioleta

Gabriel y Mulley [52] describen diversas aplicaciones de la espectrometría UV en la determinación de tensioactivos aniónicos, mientras que Nadeau y Siggia [53] han realizado un estudio similar para tensioactivos no iónicos. Hellmann [54] determinó LAS mediante espectrometría derivada.

b) Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja (IRS, *infrared spectroscopy*) es una de las técnicas más utilizadas en análisis cualitativo de tensioactivos [55-57]. La identificación de los componentes se puede realizar en base a la comparación con espectros de referencia y/o por la interpretación de picos que indican grupos funcionales específicos. Además, la identificación de moléculas más complejas se puede realizar empleando IRS en combinación con otras técnicas como son resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*), espectroscopia de absorción ultravioleta, y espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*).

c) Resonancia magnética nuclear

Se ha demostrado la versatilidad y la posibilidad de aplicación de la espectroscopia de NMR en la caracterización y determinación de tensioactivos [58-60]. Sin embargo, su aplicación ha sido escasa, debido a los numerosos requisitos que impone en lo relativo a la preparación de la muestra.

d) Absorción atómica

Diversos autores han descrito la determinación de tensioactivos catiónicos, aniónicos y no iónicos en agua mediante espectrometría de absorción atómica (AAS, *atomic absorption spectrometry*) [61-67].

Los tensioactivos aniónicos se pueden ser extraer de la matriz acuosa con un disolvente orgánico como pares iónicos con bis-etilendiamín cuprato (II). Después, el cobre se determina por AAS de llama [61] o en cámara de grafito [62, 63]. También existen procedimientos similares consistentes en la extracción del complejo de LAS con α, α'-bipiridín cuprato (II) en metil isobutil cetona, con la posterior determinación del cobre por AAS [64, 65].

Se han determinado tensioactivos catiónicos mediante la formación de un par iónico con tetracianocobaltato (II) [61], tetraciano cuprato (II) [66] o tetraciano zincato (II) [67], seguida de extracción con un disolvente orgánico. Después, se determina el metal respectivo, y su contenido se refiere a la concentración inicial de tensioactivo.

e) Espectroscopia de emisión de plasma acoplado por inducción

Pressouyre [68] desarrolló un método sensible, preciso, rápido y selectivo para determinar tensioactivos aniónicos mediante la formación de un complejo entre el tensioactivo y o-fenantrolín cuprato (II), con posterior extracción en metil isobutil cetona y medida de la señal de emisión del cobre mediante esta espectroscopia.

IX.2.3.4. Técnicas electroquímicas

Dentro de las técnicas electroquímicas, para determinar tensioactivos se ha utilizado principalmente la potenciometría con electrodos selectivos de iones [69-72].

IX.2.3.5. Técnicas cromatográficas

a) Cromatografía sobre capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC, *thin-layer chromatography*) ha sido utilizada en el estudio de la biodegradación de tensioactivos no iónicos y de sus productos intermedios [73-75]. Los tensioactivos no iónicos polietoxilados pueden ser extraídos en cloroformo, separados mediante TLC y determinados por comparación con una serie de estándares [75]. Este método permite la determinación de tensioactivos no iónicos dentro del intervalo 0.1-1 mg/l. La TLC también se ha aplicado a la separación de tensioactivos aniónicos [73, 76-78].

b) Cromatografía líquida de alta resolución

La HPLC es la técnica más ampliamente aplicada a la separación y determinación de tensioactivos. Las principales ventajas son la simplicidad y la capacidad de separación de mezclas complejas de tensioactivos en sus correspondientes homólogos e isómeros, obteniéndose buenos límites de detección tanto para especies cargadas como sin carga.

Dado que los LAS son los tensioactivos aniónicos de mayor uso, se han desarrollado numerosos métodos de HPLC para su separación. Los homólogos alquílicos se separan empleando mezclas metanol/agua conteniendo perclorato sódico, fases estacionarias apolares C8 y C18 y régimen de elución isocrática [79, 80]. Por su parte, los isómeros se pueden separar con columnas C18 mediante elución con gradiente [81]. Mezclas acetonitrilo/agua con perclorato sódico conducen a una separación parcial de los isómeros, empleándose para ello columnas de larga longitud y condiciones isocráticas [82].

La determinación de LAS en muestras ambientales mediante HPLC, tales como agua de río, aguas residuales [79, 80, 82] y lodos de depuradora [83, 84] es de gran interés. En general, se requiere la concentración previa de la muestra mediante extracción en fase sólida.

La HPLC con detección electroquímica permite determinar compuestos orgánicos en concentraciones del orden del picogramo (1-100 pg) [85-87]. La determinación de LAS [17, 80, 88-90] empleando HPLC y detección fluorescente permite alcanzar límites de detección de 0.01 mg/l en agua [91, 92] y 0.1 mg/Kg en sólidos [92].

Marcomini y Ginger [29] desarrollaron un método para determinar tanto LAS como tensioactivos no iónicos (APEs), utilizando HPLC en fase inversa, empleando columnas C8 y elución con un gradiente agua/acetonitrilo.

La cromatografía de intercambio iónico es útil para separar los diversos tipos de tensioactivos aniónicos [93], sin embargo, sólo se obtiene un único pico por cada tipo.

En el caso de tensioactivos aniónicos no absorbentes, tales como alquil sulfatos y sulfonatos, se han adoptado diversas estrategias: cromatografía de pares iónicos con

detección indirecta [94, 95], cromatografía de intercambio iónico con diferentes supresores y detección conductimétrica [96, 97], y HPLC con derivatización post-columna y detección fluorimétrica [98].

Los tensioactivos catiónicos se separan por cromatografía de intercambio iónico empleando detección UV [99] o conductimétrica [97, 100, 101], o por HPLC con formación post-columna de un par iónico [102, 103].

La HPLC se ha aplicado también a la resolución de tensioactivos no iónicos en sus correspondientes homólogos [104-113]. Debido a la variación en la longitud de la cadena alquílica (AE y APG) y el grado de etoxilación (AE, APE) o glucosilación (APG), la separación de tensioactivos no iónicos constituye un problema difícil, que a veces se resuelve mediante la aplicación de dos técnicas de separación distintas de forma secuencial o paralela. La separación de AE de acuerdo a la longitud de la cadena hidrofóbica se realiza con columnas HPLC apolares [81, 107, 109, 111]. Para la separación de homólogos de EO de AE y APE se ha utilizado una amplia variedad de fases estacionarias [107, 108, 110-113]. Para la determinación de AE, con detección espectrofotométrica, es necesaria la derivatización previa con fenil isocianato [109, 110], naftil isocianato [106] o cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo [106].

c) Cromatografía de gases

La inherente baja volatilidad de la mayoría de los tensioactivos dificulta la aplicación de la cromatografía de gases para su análisis. La separación sin derivatización está limitada a oligómeros de tensioactivos no iónicos de bajo peso molecular. Por tanto, se deben desarrollar procedimientos de derivatización adecuados, por ejemplo sililación de AS [114] y de no iónicos [24, 115], esterificación de APE, [115], cloración de LAS [116] o reacción de AE con HBr [106], o preparación de productos de descomposición volátiles mediante desulfonación de LAS con ácidos (LOD < 1 µg/l) [117]. En la mayoría de los casos, se utiliza un detector de ionización de llama, si bien los derivados halogenados se pueden determinar con el detector de captura electrónica [14].

d) Acoplamiento de masas a HPLC y GC

Durante esta ultima década, han aparecido numerosos artículos en los que se utiliza espectrometría de masas acoplada a HPLC [19, 21-23, 104, 106, 118-120] y a GC [12, 16, 83, 104-106, 121-123] para caracterizar y determinar trazas de tensioactivos. Estas técnicas proporcionan una alta selectividad y sensibilidad, y ofrecen información adicional sobre el peso molecular y la estructura de los analitos.

IX.2.3.6. Técnicas electroforéticas

a) Electroforesis en capa de gel

Swisher [34] describió la aplicación de la electroforesis en capa de gel para la separación de tensioactivos aniónicos, obteniendo una pobre separación de los homólogos. Bondenmiller y Latz [124] emplearon un gel de agarosa para llevar a cabo la separación de series de homólogos de ABS, AES y AS.

b) Electroforesis capilar

La aplicación de la electroforesis capilar al análisis de tensioactivos se ha incrementado durante estos últimos años. En la Tabla IX.1 se resumen diferentes métodos de análisis de los principales tipos de tensioactivos mediante CE.

La determinación del contenido total de LAS se ha realizado mediante el empleo de tampones borato o fosfato en ausencia de disolvente orgánico, obteniéndose un único pico [82, 125, 126]. La separación de homólogos de LAS se ha llevado a cabo usando tampones borato o fosfato a pH 7-9, empleando acetonitrilo como modificador orgánico [82, 125, 127-130] y también se ha realizado en un medio no acuoso [131].

Respecto a la separación isomérica de LAS, se han desarrollado métodos de CE con ciclodextrinas [130] o SDS en presencia de alto contenido en disolvente orgánico [125, 132].

Debido a la baja sensibilidad de la técnica, la aplicación de la CE a análisis de trazas es problemática, sin embargo, se han publicado recientemente determinaciones de LAS y sus productos de degradación en aguas residuales y lodos de depuradora [82, 125, 133], obteniéndose límites de detección del orden del µg/l (tras una preconcentración de 1000 veces) para LAS [82], e inferior a l µg/l (tras un enriquecimiento de 2500 veces) para sus productos de degradación [133].

Para la determinación de tensioactivos aniónicos no absorbentes, tales como AS, AEOS, alquil sulfonatos y alquil sulfosuccinatos, se ha recurrido a la detección indirecta, empleándose diferentes reactivos visualizadores [134-139]. El SDS se ha determinado en agua [134] y pasta dentífrica [135], usando p-hidroxibenzoato como reactivo visualizador. Con detección indirecta para alquil sulfonatos se obtienen límites de detección de 2 mg/l [136]. También se han empleado otros modos de detección alternativos a la detección indirecta en el UV, como la fluorimétrica para AS [140] y la espectrometría de masas para alquil sulfatos [141].

El análisis de tensioactivos catiónicos por CE es problemático debido a la fuerte adsorción de éstos a la pared interna del capilar. Sin embargo, la adición de modificadores orgánicos en grandes cantidades, el empleo de capilares recubiertos, o el uso de medio no acuoso han ayudado a solucionar el problema [142-147].

En lo referente a tensioactivos catiónicos no absorbentes, tales como compuestos de alquil y dialquilamonio, se han empleado numerosos reactivos visualizadores [95, 136, 142, 145, 148], siendo necesaria en todos los casos, la presencia de un alto porcentaje de disolvente orgánico para obtener eficacias y resoluciones adecuadas. Los límites de detección se hallan comprendidos entre el µg/l y el mg/l para detección indirecta de tensioactivos del tipo alquilamonio [136, 145].

La investigación de tensioactivos no iónicos por CE requiere la aplicación de un aditivo iónico para formar una pseudofase, siendo el SDS el más ampliamente empleado, junto con la adición de modificadores orgánicos en concentraciones superiores al 20%. La separación está basada en la estabilidad de los complejos de asociación solvofóbica tensioactivo-analito [149]. De esta forma, se han analizado los tensioactivos no iónicos del tipo alquilfenol, empleando tampones conteniendo SDS y altos contenidos de acetonitrilo y otros disolventes orgánicos [111, 130, 137, 150-153]. Una alternativa es la separación de los tensioactivos no iónicos mediante su derivatización previa con anhídrido ftálico, da lugar a derivados aniónicos; este procedimiento ha sido utilizado para separar APEs [137] y AEs [153]. La formación de ftalatos no sólo permite dotar a los analitos de movilidad electroforética neta, sino que además los transforma en cromóforos, permitiendo su detección en el UV.

Tabla IX.1. Métodos de determinación de los principales tipos de tensioactivos por CE.

Tensioactivo	Condiciones de separación	Aplicaciones	Ref.
LAS	Borato 50 mM, pH 8	Aguas residuales	125
	Borato 250 mM, pH 8, 30% CH_3CN	Detergentes, aguas residuales y de río, lodos de depuradora	82, 125
	HOAc 10 mM, TMAOH 20 mM en CH_3OH	Detergentes	131
	Fosfato 100 mM, pH 6.8, α-CD 20 mM, 20% CH_3CN	Mezclas técnicas	130
	Fosfato 10 mM, pH 6.8, SDS 40 mM, 30% CH_3CN	Detergentes	125
Alquilfenol éter sulfatos	Capilar μ-PAGE-3 con 7 M urea, Tampón: μ-PAGE con 7 M urea	Producto técnico	137
AS	p-Hidroxibenzoato 15 mM, pH 6, 50% CH_3CN o 5 mM NMS en CH_3OH	Cosméticos, pasta dentífrica	138
	NH_4 OAc 10 mM, pH 8.9	Producto técnico	141
	Barbital 8 mM, pH 8.5	Fármacos	135
AEOS	3,5-DNBA 5 mM, pH 9.05, 25% CH_3CN	Artículos de tocador	138
	OBS 5 mM, PTS 5 mM en CH_3OH	Detergentes	139

Tabla IX.1. (continuación).

Cloruro de benzalconio	Fosfato 20 mM, pH 4, 40-58% disolventes orgánicos (THF)	Productos técnicos, aerosol nasal	145
	Fosfato 25 mM, pH 2.5	Fármacos	146
	Fosfato 50 mM, pH 3, 50% CH_3CN	Pastillas	147
Cloruro de cetilpiridinio	Fosfato 50 mM, pH 6.8, 50% CH_3CN	Enjuague bucal	130
	Fosfato 50 mM, pH 5, 50% CH_3CN	Pastillas	147
Sales de alquil y dialquilamonio	DBDA 5 mM, fosfato 20 mM, pH 4, 40% THF	Loción facial	148
	TZV 10 mM, borato 100 mM, pH 6, 85% CH_3OH	Producto técnico	136
APE	Fosfato 10 mM, pH 6.8, SDS 70 mM, 20-35% CH_3CN	Productos técnicos, vacuna antigripal	111,130, 151
	Tris-TAPS 60 mM, pH 8.3, 3% dextrano; derivatización: BTA	Producto técnico	152
AE	Borato 150 mM, pH 8.0, 50% CH_3CN; derivatización: PA	Productos técnicos, detergentes, artículos de tocador	153

Abreviaturas: BTA, anhídrido bencenotricarboxílico; DBDA, cloruro de dodecilbencildimetilamonio; OBS, octilbencenosulfonato; DNBA, ácido dinitrobenzoico; NMS, naftaleno monosulfonato; PA, anhídrido ftálico; PTS, p-toluenosulfonato, TAPS, ácido N-[tris (hidroximetil)-metil]-3-aminopropanosulfónico; TMAOH, hidróxido de tetrametilamonio; TZV, violeta de tetrazolio.

IX.3. Referencias

1. K.J. Bock y H. Stache, Surfactants, The Handbook of Environmental Chemistry, Anthropogenic Compounds, 3 (part B), ed. O. Hutzinger, Springer-Verlag, Berlín, 1982.
2. T.A. Aboul-Kassim, Water Sci. Technol., 25 (1992) 93.
3. H.A. Wittcoff y G. Rewben, "Productos Químicos Orgánicos Industriales, Vol. 2: Tecnología, formulación y usos", ed. Limusa, México, 1987.
4. J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.Y. Martín, J.C. Diez-Masa y A. Cifuentes, J. Chromatogr. A, 823 (1998) 423.
5. J.C. Weber y J.C. Moris, J. Sanit. Eng. Div., 90 (1964) 79.
6. A. Marcomini, S. Capri y W. Ginger, J. Chromatogr., 403 (1987) 243.
7. M. Ahel y W. Giger, Anal. Chem., 57 (1985) 1577.
8. V.T. Wee y J.M. Kennedy, Anal. Chem., 54 (1982) 1631.
9. A. Marcomini, P.D. Capel, T. Liechtensteiger, P.H. Brunner y W. Giger, J. Environ. Qual., 18 (1989) 523.
10. M. Valls, J.M. Bayona y J. Albaiges, J. Environ. Anal. Chem., 39 (1990) 329.
11. N. Chalaux, J.M. Bayona y J. Albaiges, J. Chromatogr. A, 686 (1994) 275.
12. H. Hon-Nami y T. Hanya, J. Chromatogr., 161 (1978) 205.
13. H. Takada y R. Ishiwatari, Environ. Sci. Technol., 24 (1990) 86.
14. C. Wahlberg, L. Renberg y U. Wideqvist, Chemosphere, 20 (1990) 179.
15. J.A. Field, L.B. Barber II, E.M. Thurmann, B.L. Moore, D.L. Lawrence y D.A. Peake, Environ. Sci. Technol., 26 (1992) 1140.
16. M.L. Trehy, W.E. Gledhill y R.G. Orth, Anal. Chem., 62 (1990) 2581.
17. M. Kikuchi, A. Tokai y T. Yoshida, Wat. Res., 20 (1986) 643.
18. P. Schöberl, H. Klotz, R. Spilker y L. Nitschke, Tenside Surf. Det., 31 (1994) 243.
19. D.D. Popenoe, S.J. Morris, P.S. Hom y K.T. Norwood, Anal. Chem., 66 (1994) 1620.

20. E. Kubeck y C. Naylor, J. Am. Oil Chem. Soc., 67 (1990) 400.

21. A. Di Corcia, R. Samperi y A. Marcomini, Environ. Sci. Technol., 28 (1994) 850.

22. C. Crescenzi, A. Di Corcia, R. Samperi y A. Marcomini, Anal. Chem., 67 (1995) 1797.

23. K.A. Evans, S.T. Dubay, L. Kravetz, L. Dzidic, J. Gumulka, R. Mueller y J.R. Stork, Anal. Chem., 66 (1994) 699.

24. J. Steber, W. Guhl, N. Stelter y F.R. Schroder, Tenside Surf. Det., 32 (1995) 515.

25. M.A. McHugh y V. Krukonis, Supercritical Fluid Extraction Principles and Practice, Butterworths, Boston, MA, 1986.

26 D.J. Hawthorne, D.D. Walker, D.E. Whittington y B.L. Moore, J. Chromatogr., 541 (1991) 185.

27. N. Alexandrou, M.J. Lawrence y J. Pawliszyn, Anal. Chem., 64 (1992) 301.

28. W. Pinkin, LC-GC, 10 (1992) 14.

29. A. Marcomini y W. Giger, Anal. Chem., 59 (1987) 1709.

30. A. Marcomini, B. Pavoni, A. Sfriso y A.A. Orio, Mar. Chem., 29 (1990) 307.

31. W. Giger, P.H. Brunner y C. Schaffner, Science, 225 (1984) 623.

32. M.J. Rosen y H.A. Goldsmith, Systematic Analysis of Surface-Active Agents, 2ª edición, Wiley-Interscience, Nueva York, 1972.

33. G.F. Longman, The Analysis of Detergents and Detergents Products, Wiley, Londres, 1975.

34. R.D. Swisher, Surfactants Biodegradation, 2ª edición, Marcel Dekker, Nueva York, 1987.

35. T.M. Schmitt, Analysis of Surfactants, Surfactant Science Series, Vol. 40, Marcel Dekker, Nueva York, 1992.

36. M. Tsubouchi, N. Yamasaki y K. Yanagisawa, Anal. Chem., 57 (1985) 783.

37. A.W. OConnell, Anal. Chem., 58 (1986) 669.

38. B. Baleux, Cr. Acad. Sci., 274 (1972) 1617.

39. B. Baleux, P. Caumette, J.F. Coite y J.C. Lebecq, J. Fran. Hydrol., 13 (1974) 41.

40. J.Waters y C.G. Taylor, The colorimetric estimation of anionic surfactants, en Anionic surfactants: Chemical Analysis, ed. J.Ross, Marcel Dekker, Nueva York, 1977.

41. J. Waters, J.T. Garrigan y A.M. Paulson, Water Res., 20 (1986) 247.

42. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water, 16 ed., American Public Health Association, Washington, DC, 1985.

43. DIN 38409, 1980, parte 23.

44 K. Higuchi, H. Shimoishi, H. Miyata y K. Toei, Analyst, 105 (1980) 768.

45. S. Motomizu, S. Fujiwara y K. Toei, Anal. Chim. Acta, 128 (1981) 185.

46. K. Yamamoto y S. Motomizu, Analyst, 112 (1987) 1405.

47. D. Gorenc, B. Adam y B. Gorenc, Mikrochim. Acta, 1 (1991) 311.

48. J. Waters y W. Kupfer, Anal. Chim. Acta, 85 (1976) 241.

49. DIN 38409, 1989, parte 20.

50. N.T. Crabb y H.E. Persinger, J. Am. Oil Chem. Soc., 45 (1968) 611.

51. K.W. Petts y I. Sliney, Water Res., 15 (1981) 129.

52. D.M. Gabriel y K. Mulley, Identification by adsorption spectroscopy technique, en Anionic Surfactants: Chemical Analysis, J. Cross, Ed., Marcel Dekker, Nueva York, 1977, pág. 91.

53. H.G. Nadeau y S. Siggia, Nonionic surfactants, ed. M. Shick, Marcel Dekker, Nueva York, 1966.

54. H. Hellmann, Tenside Surf. Det., 31 (1994) 200.

55. R.M. Silverstein, G.C. Bassler y T.C. Morril, Spectrofotometric Identification of Organic Compounds, Wiley, Nueva York, 1991.

56. R.G.J. Miller y B.C. State, Laboratory Methods in Infrared Spectroscopy, 2ª edición, Heyden, Londres, 1982.

57. M. Sabo, J. Gross y I.E. Rosenberg, J. Soc. Cosmetic Chem., 35 (1984) 47.

58. W. Auf der Heyde, Tenside, 18 (1981) 265.

59. E.M. Thurmann, T. Willoughby, L.B. Barber y K.A. Thorn, Anal. Chem., 59 (1987) 1798.

60. G.Carminati, L. Cavalli y F. Buosi, J. Am. Oil. Chem. Soc., 65 (1988) 669.

61. J. Courtot-Coupez y A. Le Bihan, Anal. Lett., 2 (1969) 211.

62 P.T. Crisp, J.M. Eckert, N.A. Gibson, G.F. Kirkbright y T.S. West, Anal. Chim. Acta, 87 (1976) 97.

63. M.J. Gagnon, Water Res., 13 (1979) 53.

64. A. Le Bihan y J.Courtot-Coupez, Analusis, 2 (1974) 695.

65. A. Le Bihan y J.Courtot-Coupez, Anal. Lett., 10 (1977) 759.

66. A. Le Bihan y J.Courtot-Coupez, Analusis, 4 (1976) 58.

67. P. Martinez Gonzalez, C. Camara Rica y L. Polo Diez, J. Anal. Atom. Spectrom., 2 (1987) 809.

68. B. Pressouyre, Analusis, 17 (1989) 346.

69. B.J. Birch y D.E. Clarke, Anal. Chim. Acta, 67 (1973) 387.

70. B.J. Birch y R.N. Cockcroft, Ion-Selective Electrode Rev., 3 (1981) 1.

71. H.U. Dammer, Tenside Surf. Det., 32 (1995) 12.

72. N. Buschmann y R. Schulz, Tenside Surf. Det., 29 (1992) 128.

73. H. Brüschweiler, V. Sieber y H. Weishaupt, Tenside, 17 (1980) 126.

74. H. Brüschweiler, H. Gämperle y F. Schwarler, Tenside, 20 (1983) 317.

75. S.J. Patterson, E.L. Hunt y K.B.E. Tucker, J. Proc. Inst. Sewage Purif., 2 (1986) 190.

76. C. Yonese, T. Shishido, K. Kaneko y J. Maruyama, J. Am. Oil Chem. Soc., 59 (1982) 112.

77. D.W. Armstrong y G.Y. Stine, J. Liq. Chromatogr., 6 (1983) 23.

78. A. Kruse, N. Buschmann y K. Cammann, J. Planar Chromatogr., 7 (1994) 22.

79. A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi y A. Marcomini, Anal. Chem., 63 (1991) 1179.

80. A. Nakae, K. Tsuji y M. Yamanaka, Anal. Chem., 52 (1980) 2257.

81. A. Marcomini, S. Stelluto y B. Pavoni, Int. J. Environ. Anal. Chem., 35 (1989) 207.

82. C. Vogt, K. Heinig, B. Langer, J. Mattusch y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 352 (1995) 508.

83. J.A. Field, D.J. Miller, T.M. Field, S.B. Hawthorne y W. Giger, Anal. Chem., 64 (1992) 3161.

84. S.B. Hawthorne, D.J. Miller, D.D. Walker, D.E. Whittington y B.L. Moore, J. Chromatogr., 541 (1991) 185.

85. W.Y. Lin, M. Tang y J.J. Stranahan, Anal. Chem., 55 (1983) 1872.

86. J.M. Ernst, Anal. Chem., 56 (1984) 834.

87. M.F. Borgerding, W.L. Hinze y L. D. Stafford, Anal. Chem., 61 (1989) 1353.

88. C.R. Eggert, R.G. Kaley y W.E. Glendhill, Application of a laboratory fresh water lake model in the study of LAS biodegradation, en Proc. Workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments, eds. A.W. Bourquin y P.H. Pritchard, U.S. EPA report No. 600/9-79-012, 1979, 451.

89. A. Nakae, K. Tsuji y M.Yamanaka, Anal. Chem., 53 (1981) 1981.

90. D.E. Linder y M.C. Allen, J. Am. Oil Chem. Soc., 59 (1982) 453.

91. E. Matthijs y H. De Henau, Tenside, 24 (1987) 193.

92. M.A. Castles, B.L. Moore y S.R. Ward, Anal. Chem., 61 (1989) 2534.

93. Y. Yokoyama, M. Kondo y H. Sato, J. Chromatogr. A, 643 (1993) 169.

94. J.A. Boiani, Anal. Chem., 59 (1987) 2583.

95. S.A. Shamsi y N.D. Danielson, Anal.Chem., 67 (1995) 4210.

96. N. Pan y D.J. Pietrzyk, J. Chromatogr. A, 706 (1995) 327.

97. L.M. Nair y R. Saari-Nordhaus, J. Chromatogr. A, 804 (1998) 233.

98. F. Smedes y J.C. Kraak, J. Chromatogr., 247 (1982) 123.

99. R.A. Llenado y R.A. Jamieson, Anal. Chem., 53 (1981) 174R.

100. V.T.Wee y J.M. Kennedy, Anal. Chem., 54 (1982) 1631.

101. L. Nitschke, R. Muller, G. Metzner y L. Huber, Fresenius J. Anal. Chem., 342 (1992) 711.

102. P. Femandez, A.C. Alder, M.J.F. Suter y W.Giger, Anal. Chem., 68 (1996) 921.

103. K. Kummerer, A. Eitel, U. Braun, P. Hubner, F. Daschner, G. Mascart, M. Milandri, F. Reinthaler y J. Verhoef, J. Chromatogr. A, 774 (1997) 281.
104. B. Thiele, K. Günther y M.J. Schwuger, Chem. Rev., 97 (1997) 3247.
105. A.T. Kiewiet y P. De Voogt, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 185.
106. A. Marcomini y M. Zanette, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 193.
107. M. Ahel y W. Giger, Anal. Chem., 57 (1985) 2584.
108. M.S. Holt, E.H. McKerrell, J. Perry y R.J. Watkinson, J. Chromatogr., 362 (1986) 419.
109. L. Nitschke y L. Huber, Fresenius J. Anal. Chem., 345 (1993) 585.
110. A.T. Kiewiet, J.M.D. van der Stehen y J.R. Parsons, Anal. Chem., 67 (1995) 4409.
111. K. Heinig y C.Vogt, Fresenius J. Anal. Chem., 359 (1997) 202.
112. T. Cserhti y E. Forgács, J. Chromatogr. A, 774 (1997) 265.
113. P. De Voogt, K. de Beer y F. van der Wielen, TrAC, 16 (1997) 584.
114. N.J. Fendinger, W.M. Begley, D.C. McAvoy y W.S. Eckhoff, Environ. Sci. Technol., 26 (1992) 2493.
115. P. Sandra y F. David, J. High Resolut. Chromatogr., 13 (1990) 414.
116. J. McEvoy y W. Giger, Environ. Sci. Technol., 20 (1986) 376.
117. H. Leidner, R. Gloor y K. Wuhrmann, Tenside Surf. Det., 13 (1976) 122.
118. H.F. Schröder, J. Chromatogr. A, 712 (1995) 123.
119. N.J. Fendinger, W.M. Begley, D.C. McAvoy y W.S. Eckhoff, Environ. Sci. Technol., 29 (1995) 856.
120. S.D. Scullion, M.R. Clench, M. Cooke y A.E. Ashcroft, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 207.
121. R. Reiser, H.O. Toljander y W. Giger, Anal. Chem., 69 (1997) 4923.
122. A. Otsuki y H. Shiraishi, Anal. Chem., 51 (1979) 2329.
123. A. Di Corcia, J. Chromatogr. A, 794 (1998) 165.
124. I.R. Bondemiller y H.W. Latz, Anal. Chem., 43 (1971) 1354.
125. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Analyst, 123 (1998) 349.

126. K.D. Altria, I. Gill, J.S. Howells, C.N. Luscombe y R.Z. Williams, Chromatographia, 40 (1995) 527.
127. Zweigenbaum, Chromatogram, 11 (1990) 9.
128. P.L. Desbene, C. Rony, B. Desmazieres y J.C. Jacquier, J. Chromatogr., 608 (1992) 375.
129. S. Chen y D.J. Pietrzyk, Anal. Chem., 65 (1993) 2770.
130. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, J. Chromatogr. A, 745 (1996) 281.
131. H. Salimi-Moosavi y R.M. Cassidy, Anal. Chem., 68 (1996) 293.
132. P.L. Desbene y C.M. Rony, J. Chromatogr. A, 689 (1995) 107.
133. C. Kanz, M. Nölke, T. Fleischmann, H.P.E. Kohler y W. Giger, Anal. Chem., 70 (1998) 913.
134. J.M. Gibbons y S.H. Hoke, J. High Resolut. Chromatogr., 17 (1994) 665.
135. K.D. Altria, J. Elgey, P. Lockwood y D. Moore, Chromatographia, 42 (1996) 332.
136. S.A. Shamsi y N.D. Danielson, J. Chromatogr. A, 739 (1996) 405.
137. R.A. Wallingford, Anal. Chem., 68 (1996) 2541.
138. A. Monclus, M. Rodríguez y J. Masana, LC-GC Int., 9 (1996) 79.
139. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, J. Cap. Elec., 3 (1996) 263.
140. A.M. Desbene, C.J. Morin, N.L. Mofaddel y R.S. Groult, J. Chromatogr. A, 716 (1995) 279.
141. M.W.F. Nielen, J. Chromatogr. A, 719 (1995) 269.
142. C.S. Weiss, C.S. Hazlett, M.H. Datta y M.H. Danzer, J. Chromatogr., 608 (1992) 325.
143. C.E. Lin, W.C. Chiou y W.C. Lin, J. Chromatogr. A, 722 (1996) 345.
144. C.E. Lin, W.C. Chiou y W.C. Lin, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 189.
145. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 358 (1997) 500.
146. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, J. Chromatogr. A, 781 (1997) 17.
147. R.B. Taylor, S. Toasaksiri y R.G. Reid, J. Chromatogr. A, 798 (1998) 335.
148. K.D. Altria, J. Elgey y J.S. Howells, J. Chromatogr. B, 686 (1996) 111.

149. Y. Walbroehl y J. Jorgenson, Anal. Chem., 58 (1986) 479.

150. J. Bullock, J. Chromatogr. A, 645 (1993) 169.

151. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 357 (1997) 695.

152. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 359 (1997) 202.

153. J.P. Barry, D.R. Radke, W.J. Carton, R.T. Anselmo y J.V. Evans, J. Chromatogr. A, 800 (1998) 13.

154. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Anal. Chem., 70 (1998) 1885.

X. DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL Y CROMATOGRAFÍA MICELAR ELECTROCINÉTICA CON MICELAS DE DESOXICOLATO EN PRESENCIA DE ELEVADAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTE ORGÁNICO

CAPÍTULO X

DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL Y CROMATOGRAFÍA MICELAR ELECTROCINÉTICA CON MICELAS DE DESOXICOLATO EN PRESENCIA DE ELEVADAS CONCENTRACIONES DE DISOLVENTE ORGÁNICO

Capítulo publicado como artículo en J. Chromatogr. A (Anexo VI).

Resumen

Mezclas de los tensioactivos catiónicos cloruro de benzalconio (BKC, *benzalkonium chloride*) y cloruro de cetilpiridinio (CPC, *cetylpyridinium chloride*) se resolvieron con rapidez, y los solutos se determinaron de modo reproducible y fiable, usando para ello electrolitos de fondo (BGEs) conteniendo borato 80 mM a pH 8.5, sales biliares y elevadas concentraciones de disolvente orgánico. En presencia de la sal biliar, el mecanismo de separación cambia de ser puramente electroforético a un mecanismo mixto, en el que predomina la cromatografía micelar electrocinética, y que proporciona una excelente resolución para todos los solutos, incluyendo los homólogos C_{12}-C_{18} del BKC y el CPC. Para obtener una adecuada resolución con un tiempo de análisis corto, se recomienda el empleo de un BGE conteniendo desoxicolato sódico 50 mM y un 20% de tetrahidrofurano. Para incrementar la resolución, el tetrahidrofurano se puede sustituir por un 30% de etanol, si bien en este caso, también aumenta el tiempo de análisis. El procedimiento se aplicó a la determinación de tensioactivos en formulaciones industriales y domésticas, con una excelente resolución entre los homólogos, con límites de detección de unos pocos μg ml^{-1} y reproducibilidades por debajo del 2%.

Palabras clave: composición del BGE; sales biliares; cloruro de benzalconio; cloruro de cetilpiridinio

X.1. Introducción

Los tensioactivos catiónicos se suelen utilizar como agentes antimicrobianos, emulgentes, anticorrosivos y suavizantes en preparados farmacéuticos, formulaciones cosméticas, productos de limpieza, desinfectantes y otras manufacturas [1]. Por tanto, es necesario el desarrollo de procedimientos de análisis adecuados para su determinación en aguas residuales urbanas, efluentes industriales y muestras ambientales. Además, algunos tensioactivos catiónicos se producen industrialmente como mezclas de varios compuestos homólogos, por lo que la caracterización de las mezclas determinando sus componentes individuales es interesante en control de calidad industrial y en estudios ambientales. La determinación de tensioactivos catiónicos se ha realizado tradicionalmente mediante valoración en dos fases [2, 3], y también por HPLC [4-8], GC [9-11] y TLC [12-14]. Sin embargo, y a causa de su fuerte tendencia a la adsorción, los métodos cromatográficos producen elución no lineal con colas y pérdida de eficacia, por lo que la resolución es con frecuencia baja, y en muchos casos los homólogos no se pueden distinguir.

Una alternativa a la cromatografía es la CE. La determinación y caracterización de tensioactivos catiónicos mediante CZE puede llevarse a cabo mediante el uso de BGEs con concentraciones elevadas de un disolvente orgánico, lo que reduce la adsorción sobre las paredes del capilar, e impide la formación de micelas mixtas, forzando a las distintas especies químicas a migrar separadamente, como iones individuales. Con este propósito, se han empleado varios disolventes orgánicos: tetrahidrofurano (THF) [15-17], metanol [18], acetonitrilo y acetona [19-21].

En MEKC los compuestos no cargados se separan añadiendo al BGE un tensioactivo iónico en concentración superior a la concentración micelar crítica

(CMC) [22,23]. Los compuestos no cargados se discriminan en función de la estabilidad de sus respectivas asociaciones soluto-micela. Además, las micelas iónicas pueden modificar la selectividad de la separación de solutos cargados mediante interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas. Por tanto en MEKC, los solutos iónicos se pueden separar por un mecanismo mixto MEKC-CZE.

En MEKC, el tensioactivo más usado ha sido y sigue siendo el dodecilsulfato sódico (SDS) [24, 25], sin embargo, también se utilizan otros, incluyendo sales biliares como el colato sódico (SC) y el desoxicolato sódico (SDC) [26-29], y mezclas de sales biliares con SDS [30], o con éteres de polioxietileno, como el polietilén glicol (PEG) [31, 32]. Las sales biliares, que tienen la estructura grande, rígida y no lineal de los esteroides, con dos o tres grupos hidroxilo a su alrededor, además del grupo cargado en un extremo, constituyen un grupo especial de biotensioactivos, con propiedades que difieren considerablemente de la mayoría de los demás tensioactivos [33]. Al parecer, las sales biliares forman micelas en forma de hélice, con bajos número de agregación, y con la porción hidrofóbica del monómero orientada hacia el medio acuoso, mientras que la parte hidrofílica está orientada hacia el interior [34-39].

Las sales biliares proporcionan una diferente selectividad que el SDS, y exhiben diferentes propiedades cromatográficas útiles, como por ejemplo, la posibilidad de reconocer conformaciones enantioméricas [26, 40-42], así como una mayor polaridad de sus micelas [27, 41]. Además, las micelas formadas por sales biliares pueden tolerar mayores concentraciones de disolventes orgánicos (v. gr., hasta un 30% de etanol) sin que se destruya la estructura micelar. Esta característica de las sales biliares es particularmente notable, puesto que las micelas de la mayoría de tensioactivos se destruyen en medios hidro-orgánicos conteniendo concentraciones mucho menores de disolvente orgánico.

En este capítulo se ha desarrollado un procedimiento de CE para la separación de los tensioactivos catiónicos cloruro de benzalconio (BKC) y cloruro de cetilpiridinio (CPC). Estos tensioactivos se utilizan ampliamente como agentes

antimicrobianos, en el tratamiento de infecciones comunes de la boca y garganta, y el BKC también se emplea como espermicida vaginal y como desinfectante en entornos laborales, incluyendo hospitales. Por tanto, tiene un gran interés el desarrollo de procedimientos rápidos y fiables de determinación de estos tensioactivos, incluyendo los homólogos del BKC, en productos farmacéuticos y otros productos industriales. Los tensioactivos, incluyendo los homólogos del BKC, se separaron mediante CE en presencia de elevadas concentraciones de diferentes disolventes orgánicos. Además, se adicionaron SC y SDC al BGE como modificadores de la selectividad, para separar pares de picos superpuestos y para incrementar la eficacia, mediante un mecanismo mixto CZE-MEKC. El procedimiento propuesto se aplicó a la determinación de tensioactivos catiónicos en formulaciones industriales y domésticas, con una excelente resolución entre los homólogos.

X.2. Parte experimental

X.2.1. Reactivos y muestras

Se utilizaron como estándares los siguientes homólogos de BKC: cloruro de bencildimetildodecilamonio (C_{12}), cloruro de bencildimetiltetradecilamonio (C_{14}), cloruro de bencildimetilhexadecilamonio hidratado (C_{16}) (Fluka, Buchs, Suiza) y cloruro de bencildimetiloctadecilamonio (C_{18}) (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), y CPC (Sigma, St. Louis, MO, USA). También se empleó una muestra comercial de BKC (conteniendo 62.3% de C_{12}, 34.7% de C_{14} y 0.4% de C_{16}, contenidos determinados mediante HPLC en el Departamento de Control de Calidad de Fluka), así como SC, SDC (Fluka) y SDS (Merck, Darmstadt, Germany). En los estudios de optimización, se emplearon disoluciones de BKC y CPC, ambos en concentración 2 mM.

Los dos tampones usados en este estudio se prepararon mediante adición de una disolución de hidróxido sódico a una disolución de dihidrógenofosfato sódico o

de ácido bórico para alcanzar pH 7 u 8.5, respectivamente; los reactivos de grado analítico fueron suministrados por Panreac (Barcelona, España). El metanol, etanol, acetonitrilo, n-propanol y THF fueron suministrados por Scharlau (Barcelona). En las determinaciones de CMCs se utilizó rodamina 6G de Sigma. Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (desionizador Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA). Antes de su inyección, todas las disoluciones se pasaron a través de un filtro de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro (MSI, Westboro, MA, USA).

X.2.2. Instrumentación

Se utilizó un sistema de electroforesis capilar HP ^{3D} (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), equipado con un detector espectrofotométrico de fila de diodos, conectado a un ordenador HP 486/66XM. El capilar de sílice fundida empleado fue de 33.5 cm de longitud y 50 μm de diámetro interno (Supelco, Bellefonte, USA). La ventana de detección se practicó a 8.5 cm del extremo de salida. Los espectros de absorción empleados en las determinaciones de CMC se midieron con dos espectrofotómetros: un Lambda-16 (Perkin-Elmer) y uno de fila de diodos HP8453 (Hewlett-Packard).

X.2.3. Procedimientos

Diariamente, antes de una nueva sesión y entre inyecciones, se hacen circular sucesivamente por el capilar una disolución de NaOH 0.1 M durante 5 min, agua durante 1 min y el BGE durante 5 min. Al finalizar una sesión de trabajo se hace circular a través del capilar NaOH 0.1 M durante 10 min, y seguidamente agua durante otros 10 min. La inyección se realizó hidrodinámicamente, a una presión de 50 mbar durante 2 s. Salvo si se indica lo contrario, la tensión aplicada fue de 15 kV con polaridad positiva. La detección se realizó a 214 nm para el BKC, y a 214 y 254 nm para el CPC. Las muestras se disolvieron directamente en agua, exceptuando algunos preparados farmacéuticos, que fueron diluidos previamente en un pequeño

volumen de etanol. Cuando fue necesario, la identificación del pico se realizó mediante la fortificación de las muestras con estándares. Para determinar CMCs se utilizó el desplazamiento del máximo del espectro de absorción de la rodamina 6 G, que tiene lugar de forma progresiva a medida que aumenta la concentración de tensioactivo [28].

X.3. Resultados y discusión

X.3.1. Estudios de CZE

Inicialmente se intentó separar los homólogos del BKC y CPC empleando una tensión de 25 kV y dos BGEs: (i) borato 80 mM a pH 8.5; y (ii) fosfato 80 mM a pH 7. En ambos casos, la disolución que contenía la mezcla de CPC y BKC dio lugar a un pico único con una cola. Como se esperaba, el pico presentó un tiempo de migración inferior al del flujo electroosmótico. La baja eficacia y falta de resolución se atribuyó a la formación de micelas mixtas, y la cola del pico a la adsorción sobre las paredes del capilar. Por ello, se estudió la adición al BGE de concentraciones crecientes de etanol y de n-propanol, que actuasen como competidores de la adsorción y como inhibidores de la micelación.

Se observaron tres efectos: (i) una reducción del EOF, como es de esperar a causa del incremento de viscosidad y de la adsorción del alcohol sobre las paredes del capilar; (ii) un incremento progresivo de la resolución entre los picos del homólogo C_{12} del BKC, con respecto a un pico ancho único correspondiente al homólogo C_{14} y al CPC; y (iii) un incremento en la eficacia y simetría de los picos. Estos efectos se pueden explicar en base a la reducción de la adsorción y a la inhibición de la micelación, lo que permite la migración de los tensioactivos en forma de iones separados y no como micelas mixtas. Como se muestra en la Figura X.1, con un 40% de alcohol a pH 7 se observó una incipiente separación entre los picos del homólogo C_{14} y del CPC. La resolución fue mejor a este pH que a pH 8.5, siendo también

menores las colas, lo que se puede atribuir a la mayor protonación de los grupos silanol a pH 7, y a su fuerte interacción con el fosfato.

Es interesante hacer notar que el CPC y el homólogo C_{14} del BKC, cuyas masas moleculares son distintas, se superponen, mientras que el CPC y el homólogo C_{12}, que tienen exactamente la misma masa molecular, a saber, 304.3 g mol^{-1}, presentan picos separados. El mayor tiempo de migración del CPC respecto al homólogo C_{12}, se puede explicar como una consecuencia de la menor densidad de carga eléctrica sobre el nitrógeno aromático, cuya carga está parcialmente neutralizada por los electrones π, cosa que no ocurre con los nitrógenos alquil sustituidos de los homólogos del BKC. Esto conduce a una movilidad electroforética menor en términos absolutos para el CPC, con respecto al homólogo C_{12} del BKC, el cual aparece a una mayor distancia respecto al tiempo de migración del EOF.

Los experimentos posteriores se realizaron utilizando n-propanol a pH 7. Al aumentar la concentración de n-propanol hasta un 40%, se incrementó la resolución entre el pico del homólogo C_{12} del BKC con respecto al pico único debido a los otros dos solutos. A mayores concentraciones de alcohol (hasta un 60%), no se observó ningún otro cambio, salvo una progresiva reducción del EOF. Se estudió la influencia de la concentración del tampón, usando entre 20 y 120 mM de fosfato y un 40% de propanol. La máxima resolución se obtuvo con fosfato 80 mM. Reduciendo el voltaje a 15 kV, se obtuvieron valores similares de eficacia y resolución.

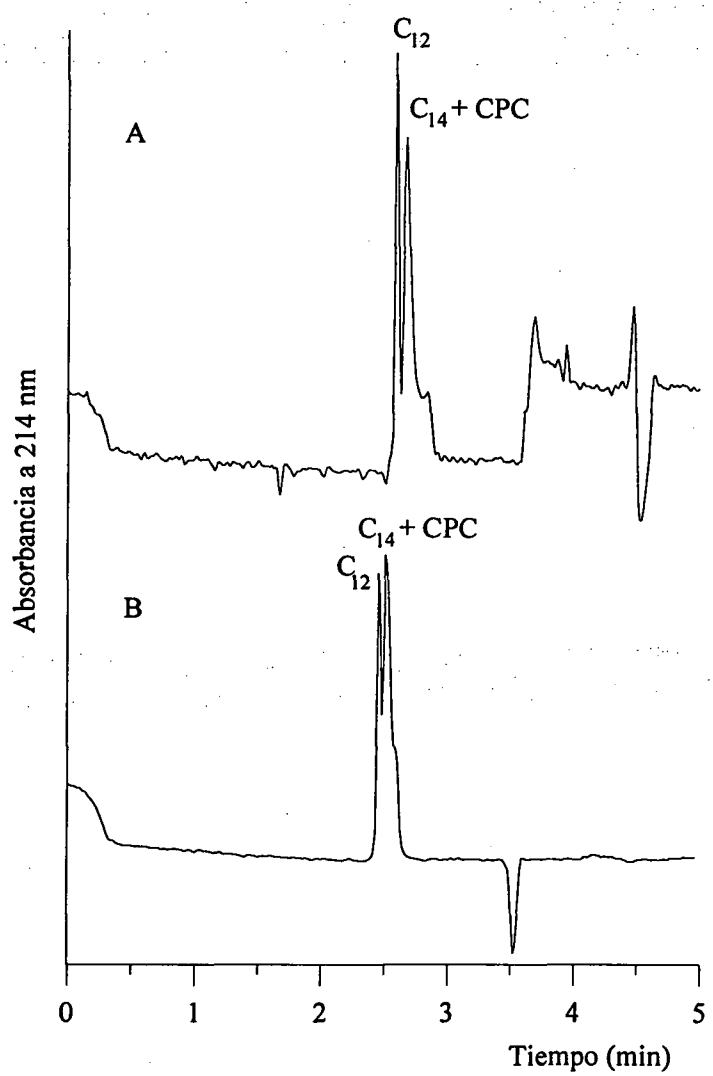


Figura X.1. Electroferogramas de una mezcla conteniendo 2 mM de BKC comercial (con un 62.3% de C_{12} y un 34.7% de C_{14}) y 2 mM de CPC. Condiciones de trabajo: 25 kV con polaridad positiva, BGE conteniendo fosfato 80 mM a pH 7.0 y 40% de etanol (A) o de n-propanol (B). La altura del pico mayor corresponde a 15 mUA.

X.3.2. Estudios de micelación y de MEKC en presencia de sales biliares

Con el fin de modificar la selectividad incrementando la resolución se intentó un enfoque distinto, basado en la adición de SC o de SDC al BGE. En general, el empleo de elevadas concentraciones de disolvente orgánico inhibe la micelación, sin embargo, las micelas de las sales biliares pueden soportar sin destruirse concentraciones de disolvente bastante más altas que la mayoría de los tensioactivos. Por tanto, en presencia de concentraciones adecuadas de disolvente orgánico, las micelas de las sales biliares pueden seguir interactuando fuertemente con las moléculas libres de otros tensioactivos. De este modo se dispone de un mecanismo de separación MEKC adicional que modifica la selectividad de las separaciones electroforéticas.

Diversos autores [29, 43-45] han recomendado el empleo de condiciones básicas para el análisis de solutos catiónicos mediante CE. Sin embargo, en medio básico los tensioactivos catiónicos pueden interactuar fuertemente con los grupos silanol extensamente ionizados de la pared del capilar. Las interacciones soluto-pared se pueden evitar adicionando una base competitiva al tampón [43], así por ejemplo, Quang y col. [44] observaron una importante mejora en la forma de los picos de aminas orgánicas cuando se incrementó la concentración de SDS, lo que se atribuyó a la efectiva concurrencia del SDS por los grupos silanol de la pared del capilar. Por tanto, la presencia de SC, o de SDC, en el BGE puede también mejorar la eficacia y reducir las colas de los picos, gracias a la competencia con los solutos por los grupos silanol.

Cuando se usa MEKC con micelas aniónicas y polaridad positiva, los picos de los solutos aparecen después del tiempo de migración del EOF y, por tanto, un medio básico puede ser importante para reducir el tiempo de análisis por incremento del EOF. Además la solubilidad de las sales biliares aniónicas, como es el caso del SC y del SDC, se incrementa en medio básico. Por estas razones, y para confirmar los puntos expuestos anteriormente, se determinó la CMC del SDC. Para ello, se preparó

una serie de tampones conteniendo borato 80 mM a pH 8.5 y cantidades crecientes de etanol (0, 10, 20, 30, 35 y 40%). Para cada concentración de etanol, se preparó una serie de disoluciones con concentraciones crecientes de SDC, todas ellas conteniendo también rodamina 6G 2.5 μM. En todos los casos, se midió la longitud de onda del máximo del espectro de absorción del colorante, $\lambda_{máx}$. Para cada concentración de etanol, se representó $\lambda_{máx}$ frente al log [SDC], y se obtuvo la CMC a partir del punto de inflexión de la curva sigmoidal (Figura X.2). Como se muestra en la Figura X.3, la CMC decrece ligeramente cuando la concentración de etanol es inferior a un 32%, y exhibe un fuerte incremento a partir de este valor. Por tanto, en un tampón borato 80 mM a pH 8.5, las micelas de SDC permanecen estables hasta que se alcanza un 32% de etanol.

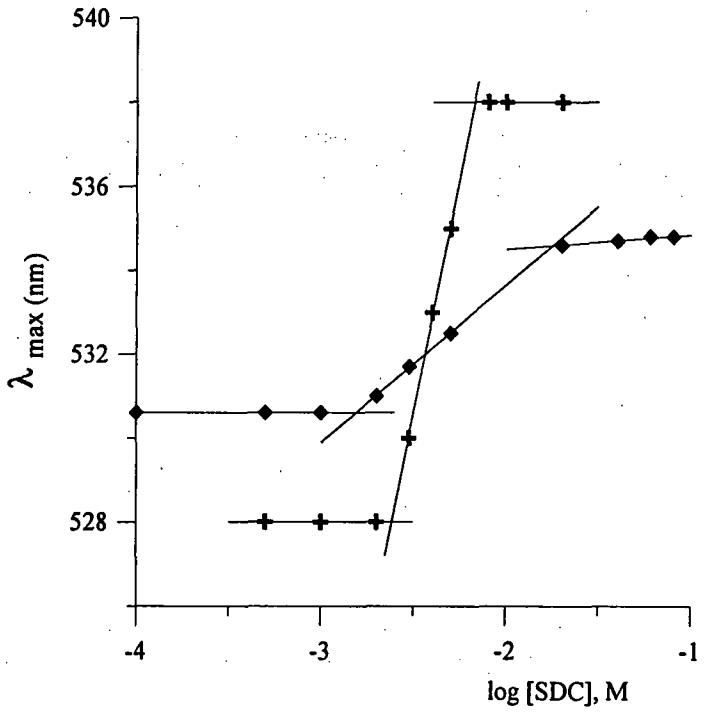


Figura X.2. Longitud de onda del máximo de absorción de la rodamina 6G frente a la concentración de SDC en un medio conteniendo borato 80 mM a pH 8.5, en ausencia de etanol (✚) y con un 30% de etanol (◆).

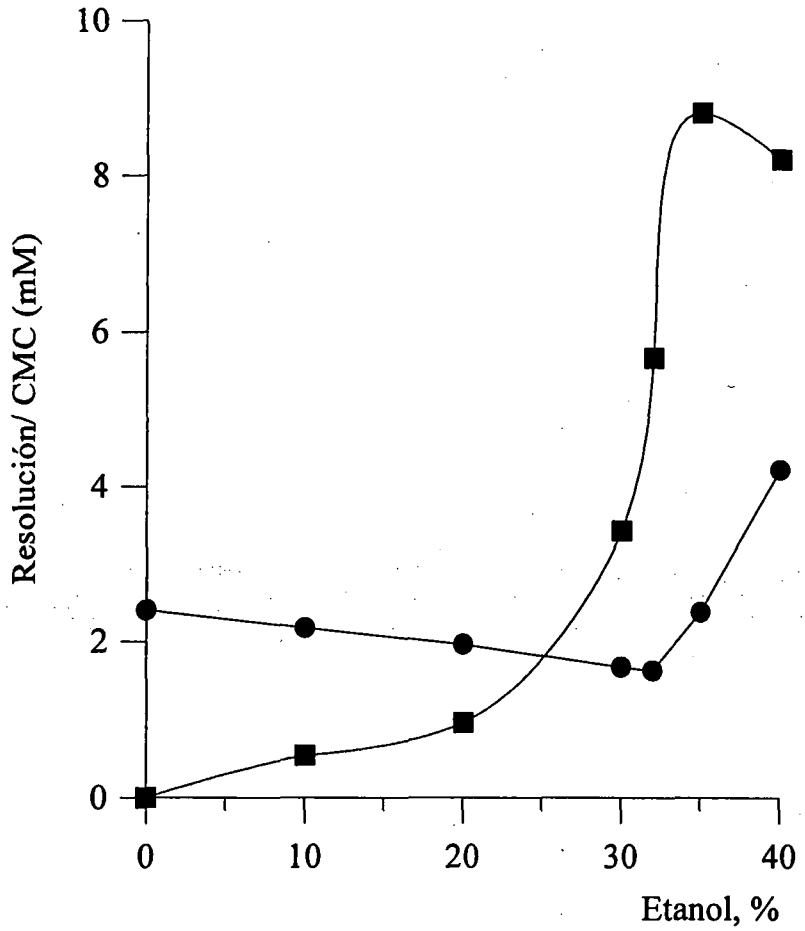


Figura X.3. CMC de SDC (●) y resolución para el par de especies químicas homólogo C_{14} de BKC y CPC (■), ambos representados frente a la concentración de etanol. Condiciones de trabajo: 15 kV, polaridad positiva, BGE conteniendo borato 80 mM a pH 8.5, SDC 50 mM y concentraciones crecientes de etanol.

A continuación, se obtuvieron los electroferogramas de una mezcla de BKC y CPC en un medio tampón borato 80 mM a pH 8.5 conteniendo 50 mM de SDC, y concentraciones crecientes de etanol, hasta un 40%. Como se puede observar en la Figura X.4, en presencia de SDC y ausencia de disolvente orgánico se obtuvo un pico estrecho y único, situado después del tiempo de migración del EOF. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de etanol, este pico se resolvió en varios. En la Figura X.3 se muestra la resolución entre el pico del homólogo C_{14} del BKC y el pico del CPC en función de la concentración de etanol. En contraste con lo que se había observado en ausencia de SDC, todos los solutos, incluyendo el CPC con respecto al homólogo C_{14} del BKC, quedaron resueltos por encima de un 10% de etanol. La resolución es pequeña por debajo de un 20% de etanol, pero se incrementa rápidamente por encima de este valor, reduciéndose por encima de un 35% de etanol. Este último valor coincide con el límite hallado anteriormente, por encima del cual se ve inhibida la formación de micelas de SDC.

Se estudió la influencia de la concentración de SDC utilizando un 30% de etanol (Figura X.5, abajo). A medida que aumenta la concentración de la sal biliar se incrementan también la resolución y el tiempo de análisis. Como se muestra en la Figura X.5, arriba, se observó un comportamiento similar utilizando SC en lugar de SDC, sin embargo, si se comparan ambos compuestos a una misma concentración, el SC da lugar a una menor resolución que el SDC.

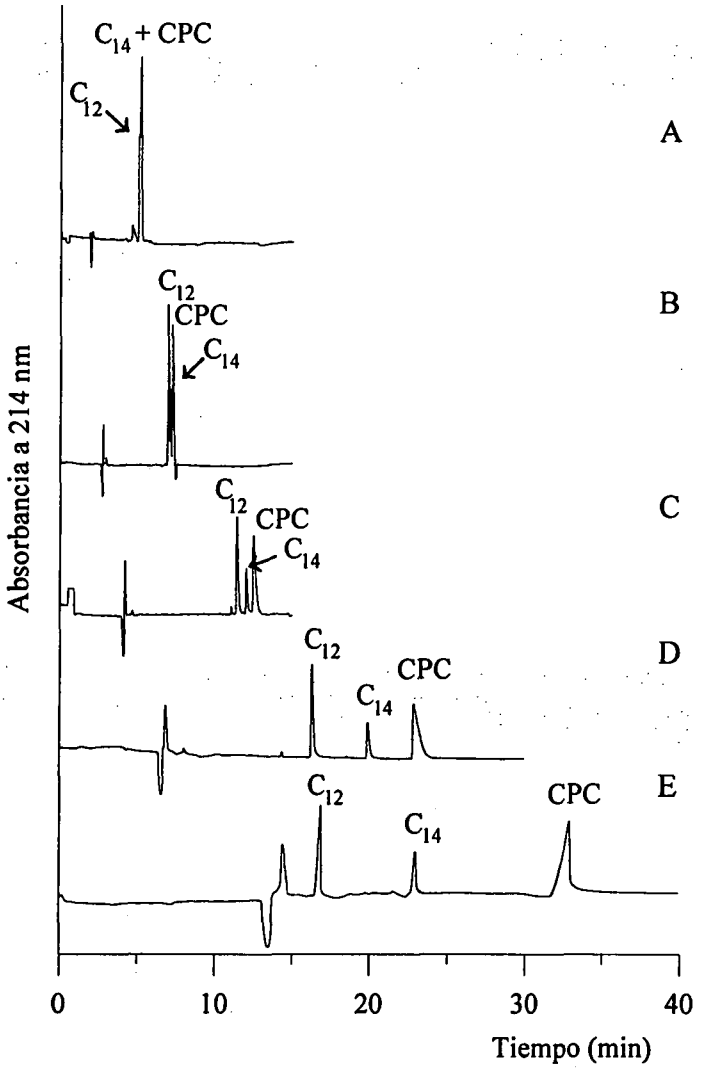


Figura X.4. Electroferogramas de una mezcla conteniendo 2 mM de BKC comercial (con un 62.3% de C_{12} y un 34.7% de C_{14}) y 2 mM de CPC. Condiciones de trabajo como en la Figura X.3; concentraciones de etanol desde A a E: 0, 10, 20, 30 y 40%, respectivamente. La altura del pico mayor corresponde a 30 mUA.

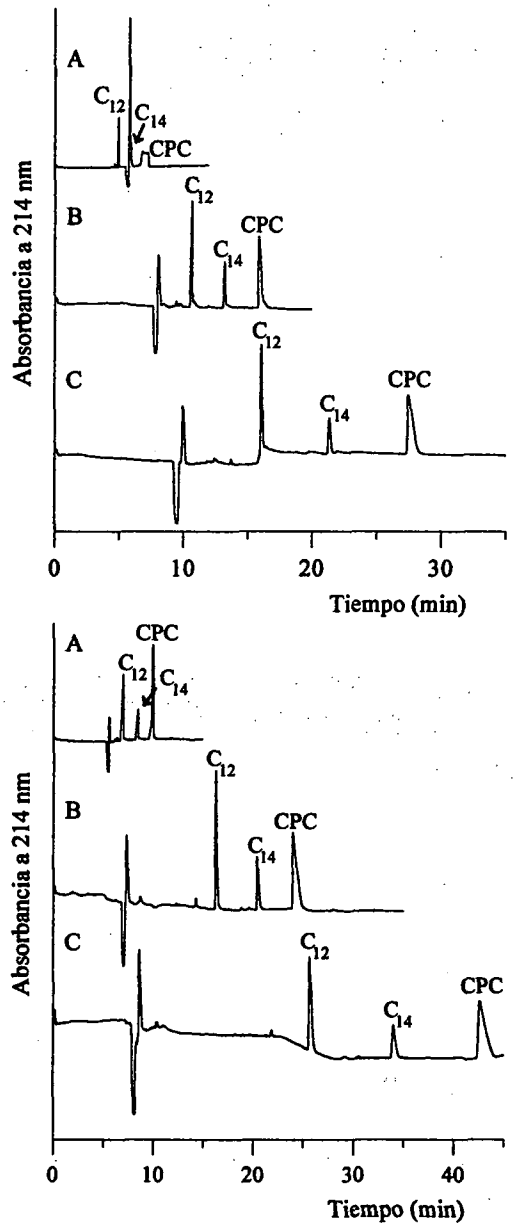


Figura X.5. Electroferogramas de la mezcla indicada en la Figura X.4. Condiciones de trabajo: 15 kV, polaridad positiva, BGE conteniendo borato 80 mM a pH 8.5, 30% de etanol y las siguientes concentraciones de sal biliar: 15 (A), 50 (B) y 75 mM (C) de SC (arriba) o de SDC (abajo). La altura del pico mayor corresponde a 30 mUA.

X.3.3. Comparación con otros disolventes y uso de otros aditivos

Manteniendo el mismo tampón borato 80 mM de pH 8.5, en presencia de SDC 50 mM, se estudió la sustitución del etanol por otros disolventes, utilizándose metanol, n-propanol, acetonitrilo y THF. En todos los casos, y como se observó en la Figura X.4 con etanol, al incrementar la concentración de disolvente orgánico, la resolución se incrementó hasta alcanzar un máximo. Para n-propanol y THF, el óptimo se encontró cerca del 20%, para acetonitrilo próximo al 30%, y para metanol fue del orden del 40%.

El THF dio lugar a una excelente resolución, con un tiempo de análisis inferior a la mitad que el obtenido con etanol (Figura X.6). Con n-propanol la resolución fue también muy buena, y el tiempo de análisis corto (menos de 10 min), sin embargo, con este disolvente una impureza del CPC apareció solapada con el pico del homólogo C_{14} del BKC. La resolución fue menor con acetonitrilo o metanol. Utilizando estos disolventes en sus respectivos óptimos de concentración, se tiene el siguiente orden creciente de resolución y de tiempo de análisis: metanol < acetonitrilo < n-propanol < THF < etanol.

Se estudió el efecto del uso de mezclas de SDC con otros tensioactivos y con PEG. Este estudio se realizó en presencia de un 20% de n-propanol. No se observaron diferencias significativas en los electroferogramas cuando se adicionaron al BGE tensioactivos no iónicos como Tween 20 o Triton X-100 en el intervalo de concentraciones entre el 1 y el 10%, o cuando se adicionaron PEG 4000, PEG 6000 o PEG 10000 en el mismo intervalo de concentraciones. En todos los casos, cuando se adicionó entre un 10 y un 40 mM de SDS se observó una disminución de la resolución y de la eficacia.

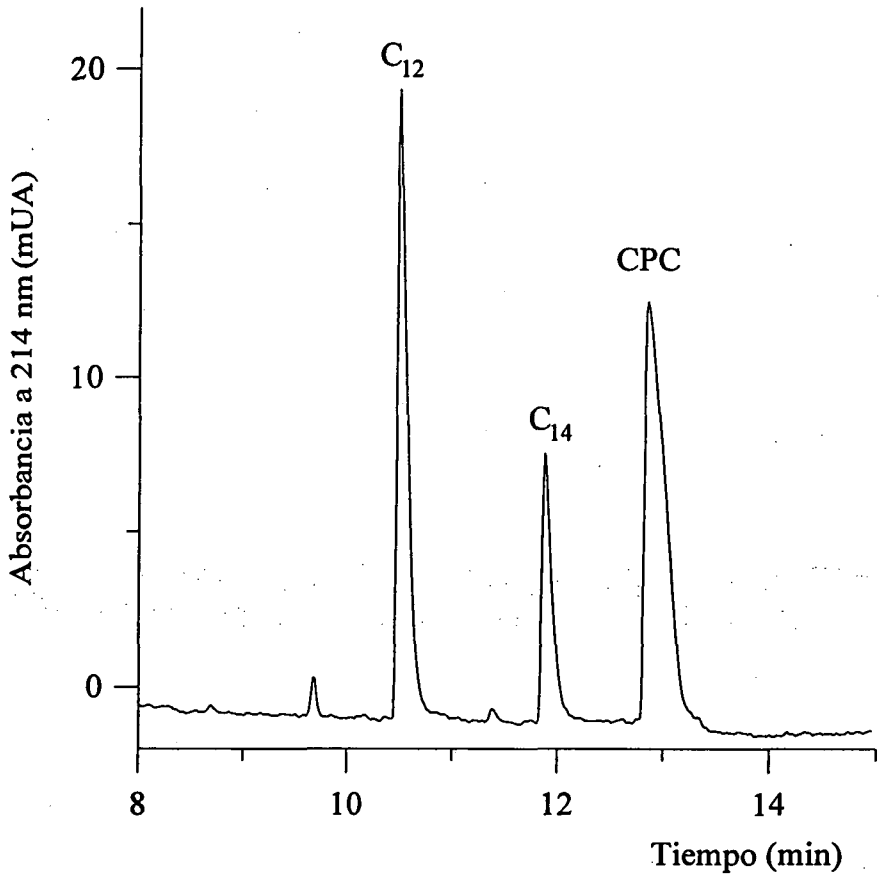


Figura X.6. Electroferograma de la mezcla indicada en la Figura X.4. Condiciones de trabajo: 15 kV, polaridad positiva, BGE conteniendo borato 80 mM borato a pH 8.5, SDC 50 mM y 20% de THF.

X.3.4. Parámetros analíticos significativos

Los parámetros analíticos significativos para la determinación de los tensioactivos, incluyendo las repetitividades de los tiempos de migración y áreas de pico, sensibilidades relativas, eficacias y límites de detección a una relación señal-ruido de 3, se obtuvieron con el tampón borato 80 mM de pH 8.5, en presencia de SDC 50 mM y 30% de etanol. Las repetitividades intra- e inter-día se obtuvieron inyectando la misma disolución 0.2 mM de los analitos tres veces por día durante 3 días consecutivos. Las curvas de calibrado para los homólogos C_{12}, C_{14}, C_{16} y C_{18} del BKC (medidos a 214 nm) y para el CPC (medido a 254 nm), se construyeron a partir de seis disoluciones estándar de cada soluto, conteniendo concentraciones igualmente espaciadas entre sí, hasta un valor máximo de 0.6 mM. Se obtuvieron líneas rectas con $r > 0.999$. Los resultados se muestran en la Tabla X.1.

Tabla X.1. Repetitividades del tiempo de migración (t_m) y del área de pico (A) [a], sensibilidades relativas (SR) [b], eficacias y límites de detección (LOD) para S/N = 3.

Analito	t_m, %	A, %	SR	$N \times 10^{-5}$, m^{-1}	LOD, $\mu g\ ml^{-1}$
C_{12}	0.7; 1.2	1.2; 1.7	1.00	4.9	3
C_{14}	0.8; 1.2	1.4; 1.7	1.01	3.4	4
C_{16}	1.0; 1.4	1.7; 2.1	0.65	2.5	8
C_{18}	1.2; 1.7	2.0; 2.5	0.57	2.05	25
CPC	0.8; 1.4	1.3; 1.9	0.70	2.3	4

[a] Desviación estándar relativa intra- e inter-día.

[b] Cociente entre las pendientes de las curvas de calibrado expresadas en mM. La absorbancia se midió a 214 nm para los homólogos de BKC, y a 254 nm para CPC.

Tabla X.2. Análisis de muestras comerciales

Muestras (fabricante), tensioactivo analizado	Declarado, %	Hallado, %
Desinfectante industrial para hospitales (Lab. Coloma, S.A.), BKC	10	9.98
Concentrado comercial de BKC (Guinama, S.A.), BKC	50	49.8
Mini-óvulo, espermicida (Lab. Lanzas, S.A.), BKC	1.18	1.13
Afta Juventus, desinfectante bucal (Labs. ERN, S.A.), BKC	0.01	0.0098
Topicaína, desinfectante dérmico (Organon Teknica, S.A.), BKC	0.5	0.5
Cuve, desinfectante dérmico (Labs. Pérez Giménez), CPC	0.1	0.096
Silidermil polvo, desinfectante dérmico (Fides-Rottapharm, S.A.), CPC	0.5	0.48
Deli Plus, elixir bucal (Faman Cosmetics, S.L.), CPC	0.025	0.025
Deli Plus con fluoruro, elixir bucal (Faman Cosmetics, S.L.), CPC	0.05	0.049

X.3.5. Aplicación a muestras reales

El procedimiento propuesto se aplicó a la identificación y cuantificación de los homólogos del BKC y CPC en diferentes preparados farmacéuticos, cosméticos, desinfectantes industriales y productos de limpieza. Los resultados se muestran en la Tabla X.2. Como se puede observar en la Figura X.7 para dos muestras, los picos aparecieron bien resueltos, y con un ruido de fondo bajo. En todos los casos, las concentraciones encontradas para el CPC y BKC, ésta última calculada como la suma de sus correspondientes homólogos, concuerdan satisfactoriamente con la composición declarada. Para la muestra de Guinama, la composición en homólogos encontrada fue: 67.6% de C_{12}, 29.0% de C_{14} y 3.4% de C_{16}, siendo los valores declarados: 68% de C_{12}, 29% de C_{14} y 3% de C_{16}.

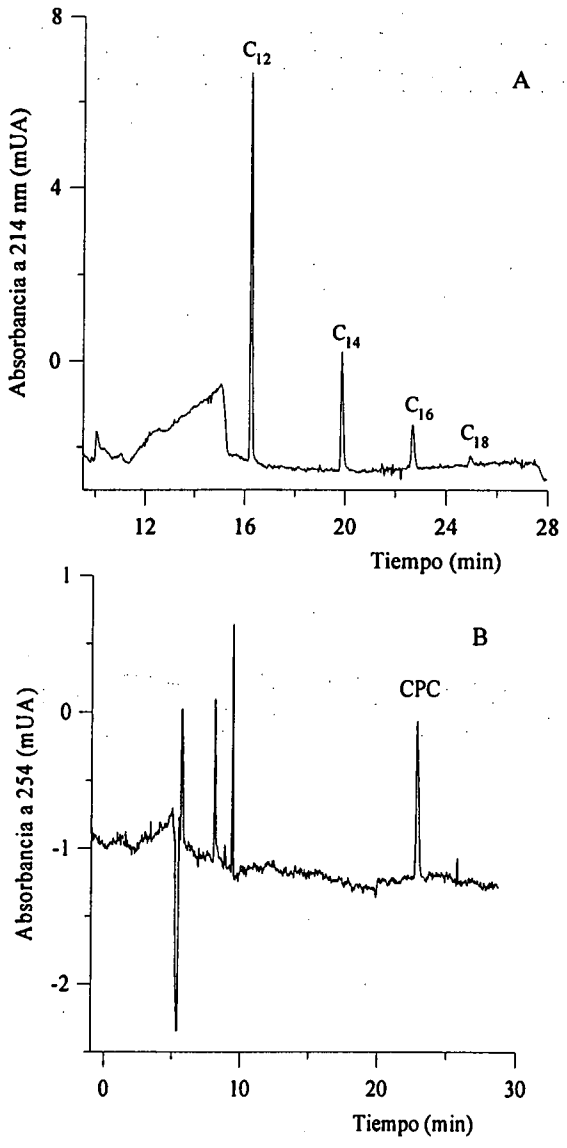


Figura X.7. Electroferogramas de un desinfectante industrial para hospitales (A) y de un desinfectante bucal (B). Condiciones de trabajo como en la Figura X.6, pero utilizando un 30% de etanol en lugar de THF.

X.4. Conclusiones

Utilizando BGEs que contengan una sal biliar y elevadas concentraciones de un disolvente orgánico, las mezclas de tensioactivos catiónicos se pueden resolver reproduciblemente y con rapidez, con una excelente resolución entre los homólogos, y se puede llevar a cabo su determinación con fiabilidad. Cuando la sal biliar está presente, los mecanismos de la separación cambian desde el puramente electroforético (CZE), a un mecanismo mixto en el que predomina la cromatografía micelar electrocinética (MEKC). Para separar mezclas de BKC y CPC con una máxima resolución se recomienda un BGE que contenga tampón borato 80 mM de pH 8.5, 50 mM de SDC y 30% de etanol. En cambio, si lo que se desea es obtener una adecuada resolución con un tiempo de análisis corto, se recomienda sustituir el etanol por un 20% de THF. Se pueden resolver mezclas de éstos o de otros tensioactivos catiónicos usando diferentes sales biliares a concentraciones adecuadas. Los tensioactivos y sus homólogos se pueden determinar con reproducibilidades por debajo del 2%, y con límites de detección de unos pocos $\mu g\ ml^{-1}$. Estos límites se pueden mejorar utilizando celdas de camino óptico extendido. El procedimiento propuesto es útil para determinar tensioactivos catiónicos en una amplia gama de productos industriales y domésticos.

X.5. Referencias

1. J. Cross, E.J. Singer, Cationic surfactants. Analytical and Biological Evaluation (Surfactant Science Series, Vol. 53), Marcel Dekker, Nueva York, 1994, Cap. 1, pág. 3.
2. Surface Activate Agents, Detergents, Determination of Cationic-Active Matter, Direct Two-Phase Titration Procedure ISO 2871, ISO, Bruselas, 1971.
3. Surface Activate Agents, Detergents, Determination of Anionic-Active Matter, Direct Two-Phase Titration Procedure ISO 2271, ISO, Bruselas, 1971.
4. G. Bleau y M. Desaulniers, J. Chromatogr., 487 (1989) 221.
5. D.F. Marsh y L.T. Takahashi, J. Pharm. Sci., 72 (1983) 521.
6. S.L. Abidi, J. Chromatogr., 324 (1985) 209.
7. S.L. Abidi, J. Chromatogr., 362 (1986) 33.
8. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, J. Chromatogr. A, 745 (1996) 281.
9. D. Campeau, I. Gruda, Y. Thibeault y F. Legrenge, J. Chromatogr., 405 (1987) 305.
10. M. Abdel-Rehim, M. Hassan y H. Ehrson, J. High Resolut. Chromatogr., 13 (1990) 252.
11. S. Suzuki, Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Mori y Y. Watanabe, J. Chromatogr., 463 (1989) 188.
12. D.W. Armstrong y G.Y. Sline, J. Liq. Chromatogr., 6 (1983) 23.
13. J. Paesen, I. Quintens, G. Thoithi, E. Roets, G. Reybrouk y J. Hoogmartins, J. Chromatogr. A, 677 (1994) 377.
14. C. Yonese, T. Shihido y K. Maruyama, J. Am. Oil Chem. Soc., 59 (1982) 112.
15. C.S. Weiss, J.S. Hazlett, M.H. Datta y M.H. Danzer, J. Chromatogr., 608 (1992) 325.
16. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 358 (1997) 500.
17. E. Piera, P. Erra y M.R. Infante, J. Chromatogr. A, 757 (1997) 275.

18. S.A. Shamsi y N.D. Danielson, Anal. Chem., 67 (1995) 4210.
19. C.-E Lin, W.-C. Chiou y W.-C. Lin, J. Chromatogr. A, 722 (1996) 345.
20. C.-E Lin, W.-C. Chiou y W.-C. Lin, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 189.
21. R.B. Taylor, S. Toasaksiri y R. G. Reid, J. Chromatogr. A, 798 (1998) 335.
22. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya y T. Ando, Anal. Chem., 56 (1984) 111.
23. S. Terabe, K. Otsuka y T. Ando, Anal. Chem., 57 (1985) 834.
24. M.G. Khaledi, J. Chromatogr. A, 780 (1997) 3.
25. P.G. Muijselaar, K. Otsuka y S. Terabe, J. Chromatogr. A, 780 (1997) 41.
26. S. Terabe, M. Shibata y Y. Miyashita, J. Chromatogr., 480 (1980) 403.
27. H. Nishi, F. Tsukasa, M. Matsuo y S. Terabe, J. Chromatogr., 498 (1990) 313.
28. R. Cole, M. Sepaniak, W. Hinze, J. Gorse y K. Oldiges, J. Chromatogr., 557 (1991) 113.
29. A. Citterio, R. Sebastiano y D. Lucchini, en: "Separation of quaternary alkylammonium salts by MEKC" presentado en el XI International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, 4-7 Octubre 1998, Venecia, Italia.
30. J.G. Bumgarner y M.G. Khaledi, Electrophoresis, 15 (1994) 1260.
31. J.G. Clothier, Jr., L. Daley y S.A. Tomellini, J. Chromatogr. A, 683 (1996) 37.
32. J.G. Clothier, Jr., y S.A. Tomellini, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 179.
33. D. M. Small, en: The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism, Plenum Press, Nueva York, 1971, Cap. 8, págs. 249-356.
34. D. M. Small, Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser., 84 (1968) 31.
35. D.M. Small, S.A. Penkett y D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta, 176 (1969) 178.
36. G. Conte, R. Di Blasi, E. Giglio, A. Paretta y N.V. Pavel, J. Phys. Chem., 88 (1984) 5720.
37. G. Esposito, E. Giglio, A. Paretta y A. Zanobi, J. Phys. Chem., 91 (1987) 356.

38. A.R. Campanelli, E. De Sanctis, E. Chiessi, M. D'Alagni, E. Giglio y L. Scaramuza, J. Phys. Chem., 93 (1989) 1536.

39. A. Coello, F. Meijide, E. Rodríguez-Nuñez y J. Vázquez-Tato, J. Pharm. Sci., 85 (1996) 9.

40. H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo y S. Terabe, J. Chromatogr., 515 (1990) 233.

41. R. Cole, M. Sepaniak y W. Hinze, J. High Resolut. Chromatogr., 13 (1990) 579.

42. S. Terabe, H. Nishi, T. Fukuyama y M. Matsuo, J. Microcol. Separ., 1 (1989) 234.

43. J.K. Strasters y M.G. Khaledi, Anal. Chem., 63 (1991) 2503.

44. C. Quang, J.K. Strasters y M.G. Khaledi, Anal. Chem., 66 (1994) 1646.

45. J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.Y. Martín, J.C. Diez-Masa y A. Cifuentes, J. Chromatogr. A, 823 (1998) 423.

XL DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS ALQUILFENOL ETOXILADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA MICELAR ELECTROCINÉTICA CON SALES BILIARES

CAPÍTULO XI

DETERMINACIÓN DE TENSIOACTIVOS ALQUILFENOL ETOXILADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA MICELAR ELECTROCINÉTICA CON SALES BILIARES

Capítulo publicado como artículo en Electrophoresis (Anexo VII).

Resumen

Los tensioactivos no iónicos octil y nonilfenol etoxilados (OPEs y NPEs) con diferente número de unidades de óxido de etileno (valores medios: n = 10 y 40 para OPEs, y n = 10 para NPEs) se separaron mediante cromatografía micelar electrocinética. La separación se realizó aplicando polaridad positiva, y utilizando un tampón borato 80 mM de pH 8.5 que contenía desoxicolato sódico (SDC) o colato sódico (SC). Cuando se adicionó SDS al electrolito de fondo, en ausencia de sal biliar, se obtuvo un pico único, que presentó un tiempo de migración mayor que el correspondiente al del flujo electroosmótico. Sustituyendo el SDS por una sal biliar se consiguió resolver los homólogos. A una misma concentración de sal biliar, la separación entre los homólogos fue mayor con SDC que con SC. La resolución óptima se alcanza cuando se emplea SDC en concentración 50 mM. En presencia de bajos o moderados porcentajes de acetonitrilo, o de n-propanol, la línea base se mejora notablemente, mientras que la resolución puede incrementarse o decrecer ligeramente. Se propone un procedimiento para la determinación de OPEs y NPEs con una resolución óptima entre los homólogos. También se propone, y se aplica a diversas muestras, un método modificado que aumenta la selectividad para la determinación en una sola inyección de otros tensioactivos absorbentes no iónicos, catiónicos y aniónicos (como los alquilbenceno sulfonatos lineales) en productos industriales y domésticos. El límite de detección fue cercano a 28 $\mu g\ ml^{-1}$ para NPE

(n =10), y las reproducibilidades de las áreas de los picos fueron 1.7% (intra-día) y 5.6% (inter-día).

Palabras clave: Alquilfenol etoxilados; Cromatografía micelar electrocinética; sales biliares; desoxicolato sódico

XI.1. Introducción

Los alquifenol polietoxilados (APEs) constituyen una clase de tensioactivos no iónicos importantes para un gran número de procesos industriales, incluyendo los sectores del papel, textil, recubrimientos, herbicidas y pesticidas agrícolas, aceites lubricantes y combustibles, metales y plásticos. En la industria del plástico, los APEs son usados como aditivos suavizantes y estabilizadores, y como filtros de la radiación UV para prevenir el amarilleo. Las aplicaciones industriales comprenden el 55% del total del mercado de APEs. El restante sector del mercado incluye productos de limpieza industrial y comunitaria (30%), limpiahogares (15%) y productos para otros usos como, por ejemplo cosméticos (< 1%) [1]. Desde su introducción en los años 40, se han venido produciendo vertidos de APEs al ambiente acuático. Su toxicidad e impacto ambientales constituyen una cuestión importante y controvertida.

Las dos principales clases de APEs, los octil y nonilfenol etoxilados (OPEs y NPEs, respectivamente), poseen una cadena hidrofílica que contiene un número variable de moles de óxido de etileno (EO). La biodegradación de APEs se caracteriza por la formación de metabolitos biorefractarios, como son los alquilfenoles completamente desetoxilados (APs), y los mono y dietoxilados APs [2, 3]. Estos compuestos son fuertemente lipofílicos se acumulan en organismos acuáticos, y se adsorben fuertemente en los sedimentos. Por esta razón, son potencialmente más tóxicos que los APEs hidrofílicos.

Se ha encontrado que los metabolitos lipofílicos de los APEs afectan al sistema endocrino de peces y mamíferos, alterando los niveles de hormonas como el estrógeno [5-11]. La toxicidad de los APEs se incrementa con la disminución de la longitud de la cadena etoxilada [8]. Además, trazas de APEs pueden estimular el crecimiento de células cancerígenas en las glándulas mamarias [12-15]. Sin embargo, otros estudios indican que el impacto ambiental de los APEs es muy bajo [1, 16].

Por todo ello, se requieren procedimientos analíticos adecuados para la determinación de APEs en productos industriales, productos para uso doméstico, alcantarillado urbano, vertidos industriales y muestras ambientales. Además, los APEs se producen industrialmente como mezclas de homólogos con una amplia distribución en el número de unidades de EO. Por tanto, la caracterización del perfil de homólogos es interesante en los estudios industriales y ambientales. Recientemente, se han revisado [17] los métodos analíticos empleados a lo largo de muchos años en la extracción, separación cromatográfica y cuantificación de los APEs y compuestos afines en muestras ambientales, incluyendo aguas, vertidos, sedimentos y lodos. Tras la extracción líquido-líquido, Soxhlet, en fase sólida o mediante fluidos supercríticos, los APEs se pueden separar mediante cromatografía líquida (LC) convencional o en fase inversa [17-23], y por GC, utilizando una amplia variedad de detectores habituales, incluyendo espectrometría de masas [17, 19-21, 24].

Una alternativa a la cromatografía es la electroforesis capilar. Los APEs se han resuelto en sus homólogos, y se han determinado mediante electroforesis capilar en gel con derivatización previa con anhídrido ftálico [25]. Sin embargo, la separación de APEs no derivatizados también es posible gracias a la cromatografía micelar electrocinética (MEKC), un modo de electroforesis capilar capaz de separar compuestos no cargados [26, 27]. En MEKC se adiciona al electrolito de fondo (BGE) un tensioactivo iónico que se asocia con el analito. Los solutos no cargados se discriminan en función de la diferente estabilidad de los complejos de asociación soluto-micela. Se ha demostrado la posibilidad de determinar y caracterizar APEs mediante MEKC utilizando un electrolito de fondo con dodecil sulfato sódico (SDS)

[22, 23, 28-30]. En ausencia de un disolvente orgánico, los APEs están fuertemente asociados a las micelas de SDS, obteniéndose un único pico que presenta un tiempo de migración mayor que el tiempo del flujo electroosmótico. Este pico puede ser usado para determinar el contenido total de APEs, aunque otros compuestos hidrofóbicos absorbentes pueden interferir [23, 29]. En presencia de una elevada concentración de disolvente orgánico (por ejemplo, 35-40% de acetonitrilo), se destruyen las micelas de SDS y APEs y los diferentes homólogos se separan por asociación solvofóbica con los iones aislados de SDS [22, 23, 28-30].

El tensioactivo más ampliamente utilizado en MEKC es el SDS [31-33], pero también se han usado sales biliares [34-36], y mezclas de sales biliares con SDS [37], o con éteres de polioxietileno [38, 39]. Las sales biliares, que tienen la estructura grande, rígida y plana del núcleo de esteroide, con dos o tres grupos hidroxilo alrededor, constituyen un grupo especial de tensioactivos, con propiedades que difieren considerablemente de los tensioactivos alifáticos y aromáticos ordinarios [40]. Las sales biliares, incluyendo el colato sódico (SC) y el desoxicolato sódico (SDC), forman pequeñas micelas helicoidales, con la porción hidrofóbica del monómero orientada hacia la disolución acuosa, mientras que la parte hidrofílica está orientada hacia el interior [41-46]. Las sales biliares proporcionan una alternativa al uso de SDS, y exhiben propiedades cromatográficas particulares, que incluyen la posibilidad de discriminar enantiómeros [47-49], e incrementar la polaridad de la micela [34,48].

En el Capítulo anterior, usamos las sales biliares para separar tensioactivos catiónicos en un medio que contenía micelas de SDC y elevadas concentraciones de etanol o tetrahidrofurano [50]. En este Capítulo, se estudia la separación mediante MEKC de los homólogos de los APEs usando sales biliares en ausencia y presencia de disolventes orgánicos y de SDS. Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación simultánea de APEs, y de otros tensioactivos absorbentes no iónicos (como dietanolamida de coco, CODEA) y alquilbencenosulfonatos lineales (LAS),

con una excelente resolución entre los homólogos de todos los tensioactivos. El método se ha aplicado al análisis de productos industriales y domésticos.

XI.2. Materiales y métodos

XI.2.1. Reactivos y muestras

Se empleó NPE con una media de 10 moles de EO, y los OPEs Tritón X-100 y Tritón X-405, con medias de 10 y 40 moles de EO, respectivamente (Fluka, Buchs, Suiza). También, se usaron colato, desoxicolato y dodecilsulfato sódicos (Fluka). La optimización de las condiciones de separación se realizó en todos los casos inyectando las siguientes disoluciones de prueba: NPE, Tritón X-100, Tritón X-405 y una mezcla de estos dos últimos. La concentración de los tensioactivos en las disoluciones de prueba fue de 500 $\mu g\ ml^{-1}$.

El hidróxido sódico y el ácido bórico de grado analítico fueron suministrados por Panreac (Barcelona). El acetonitrilo y el n-propanol fueron obtenidos de Scharlab (Barcelona). Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (Barnstead, Sybron, Boston , MA) y se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.45 µm de diámetro de poro (MSI, Westboro, MA).

Algunos tensioactivos puros suministrados por las industrias también se utilizaron como estándares en el análisis de productos industriales y domésticos: CODEA (EMPILAN 2502, Albright & Wilson Ibérica, Barcelona), NPE con n = 10 (EMPILAN NP 10, Albright & Wilson Ibérica y DEHYDROPHEN PNP 10, Pulcra-Henkel Ibérica, Barcelona), LAS (conteniendo un 8.7% de C_{10}, 40.6% de C_{11}, 34.7 de C_{12} y 14.3% de C_{13}, Petresa, San Roque, Cádiz) y cloruro de benzalconio (BKC, conteniendo 62.3% de C_{12}, 34.7% de C_{14} y 0.4% de C_{16}, Fluka). Cuando fue necesario, la asignación de los picos se confirmó mediante fortificación de las muestras con estos estándares.

XI.2.2. Instrumentación

Se empleó un equipo de electroforesis HP^{3D} (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) provisto de un sistema de detección de fila de diodos. Se emplearon capilares de sílice fundida (Supelco, Bellefonte, PA) de 48.5 cm (40 cm de longitud efectiva) x 50 µm de diámetro interno (363 µm de diámetro externo). Las separaciones se realizaron a 15 kV con polaridad positiva. La detección se llevó a cabo a 200 nm. La inyección se practicó hidrodinámicamente, bajo una presión de 50 mbar durante 2 s. Diariamente antes de iniciar una sesión, el capilar se lavó con una disolución 0.1 M de NaOH, seguida por agua, y finalmente por el tampón de separación, durante 5 min en cada caso. Entre inyecciones sucesivas, el capilar se acondicionó con NaOH 0.1 M (5 min) y con el tampón de separación (7 min). Al finalizar cada sesión de trabajo el capilar se rellenó con NaOH 0.1 M durante 10 min, y finalmente con agua durante otros 10 min.

XI.2.3. Procedimiento recomendado

Se pesan entre 0.2 y 1 g de muestra, se diluye con agua (o con n-propanol si es necesario) hasta 25 ml, se filtra y se inyecta. Los BGEs recomendados son: (i) para obtener la máxima resolución de homólogos de los APEs con $10 \leq n \leq 40$, en ausencia de otros tensioactivos absorbentes, una disolución de borato 80 mM de pH 8.5, a la que se adiciona SDC hasta 50 mM y un 10% de acetonitrilo o n-propanol; (ii) para un aumento de la selectividad con muestras que contienen APEs junto con otros tensioactivos absorbentes, borato 80 mM de pH 8.5, conteniendo SDC 75 mM y un 20% de acetonitrilo o propanol.

XI.3. Resultados y discusión

XI.3.1. Estudios de optimización

a) Estudios MEKC con SDS

Como se muestra en la Figura XI.1, parte A, todas las posibles combinaciones de estándares, inyectadas en un BGE que contenía borato 80 mM de pH 8.5, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de acetonitrilo o n-propanol, dio lugar a un pico único con un tiempo de migración coincidente con el del EOF. En ausencia de disolvente orgánico, el pico único mostró una pequeña cola, indicando adsorción sobre la pared del capilar.

Posteriormente, se utilizó el mismo tampón en ausencia de disolvente orgánico, pero con concentraciones crecientes de SDS. Como se muestra en la Figura XI.1, partes B-D, cuando la concentración de SDS aumenta, el pico único aparece a tiempos de migración progresivamente superiores a los del EOF. Esto es debido a la fuerte asociación de los solutos con las micelas aniónicas de SDS. Sin embargo, como se muestra en la Figura XI.1, partes C y D, se observa una incipiente separación entre el Tritón X-100 y el Tritón X-405, cuando se emplean concentraciones de SDS superiores a 50 mM. Al mismo tiempo, el pico no muestra cola y aumenta la eficacia, lo que se puede atribuir a la asociación del soluto con el SDS. Además, el SDS inhibe la adsorción de los solutos, debido a la competencia del mismo por los sitios activos de la pared del capilar. De acuerdo con los resultados de la bibliografía [22, 23, 28-30], los homólogos de los OPEs y NPE se pueden resolver cuando se adiciona un 35% de acetonitrilo a un BGE que contiene 50 mM de SDS.

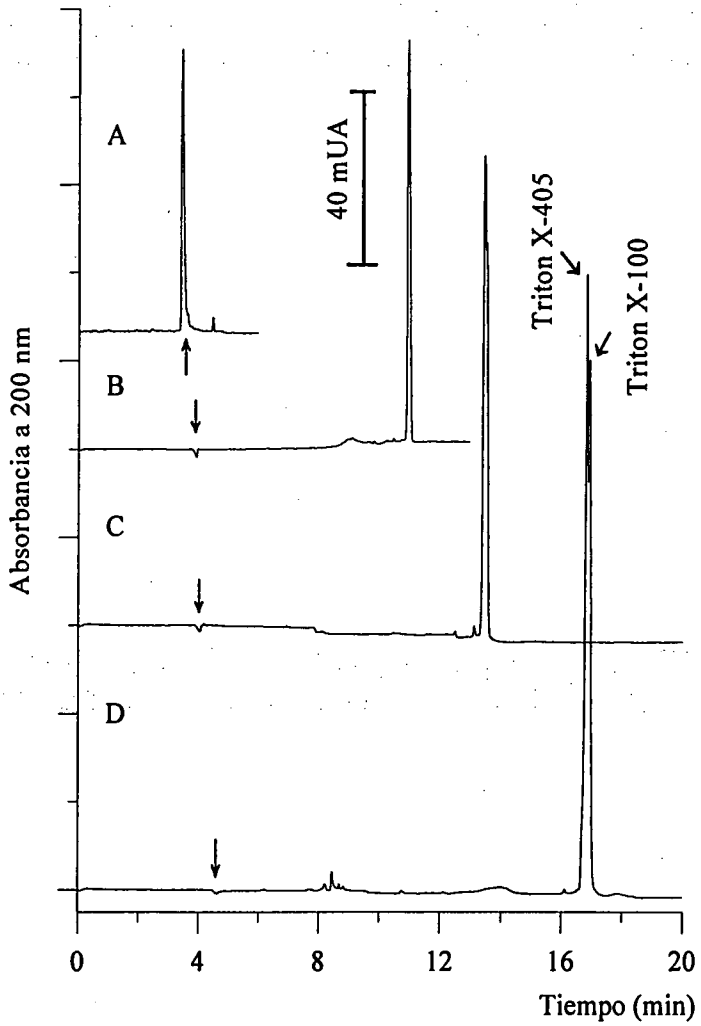


Figura XI.1. Electroferogramas de una mezcla de Tritón X-100 y Tritón X-405, concentración de 500 μg ml^{-1} cada uno, obtenidos con un BGE conteniendo tampón borato 80 mM a pH 8.5 y concentraciones crecientes de SDS (0, 25, 50, 100 mM). Voltaje aplicado, 15 kV, polaridad positiva, longitud de onda de detección, 200 nm. Las flechas indican el tiempo de migración del EOF (marcado con 1% metanol en la muestra).

b) Estudios MEKC con sales biliares

En la Figura XI.2, se muestra la resolución de los homólogos, en ausencia de SDS y de disolvente orgánico, utilizando en cambio SDC como fase pseudoestacionaria y agente discriminante. Se estudió la influencia de la concentración de SDC, así como la de SC, en la resolución de homólogos. Para ello se evaluó la resolución global, que se definió como la media geométrica de las resoluciones entre los picos consecutivos de los tres homólogos más abundantes de cada tensioactivo. Los resultados se muestran en la Figura XI.3, observándose una resolución óptima con una concentración 50 mM de SDC. Para conseguir valores similares de resolución utilizando SC, se requirieron concentraciones superiores a 50 mM. Este es un comportamiento general [37, 50] que se puede atribuir a la mayor capacidad del SDC para asociarse con solutos hidrofóbicos, en comparación con el SC, el cual tiene un grupo hidroxilo adicional.

Como se observa en la Figura XI.2, y como consecuencia de la asociación con las micelas de las sales biliares, los tiempos de migración de los solutos son mayores que el tiempo de migración del EOF. El retraso se puede explicar en términos de diferencias tanto de masa molecular como de hidrofobicidad. Se puede esperar un mayor retraso para solutos con una masa molecular pequeña, ya que éstos presentan más resistencia frente al EOF. Por tanto, para solutos con una hidrofobicidad media similar, los homólogos con un menor número de EO deben aparecer a mayores tiempos de migración. Por otra parte, estos solutos son más hidrofóbicos y, por tanto, se asocian más fuertemente a las micelas de las sales biliares. También por esta razón, deben aparecer a tiempos de migración altos. Esto es precisamente lo que se observa en la Figura XI.2, donde el Tritón X-100 (n = 10) presenta un tiempo de migración mayor que el Tritón X-405 (n = 40). Además, para un APE en particular, los picos con menor tiempo de migración deben corresponder a los homólogos con mayor número de unidades de EO.

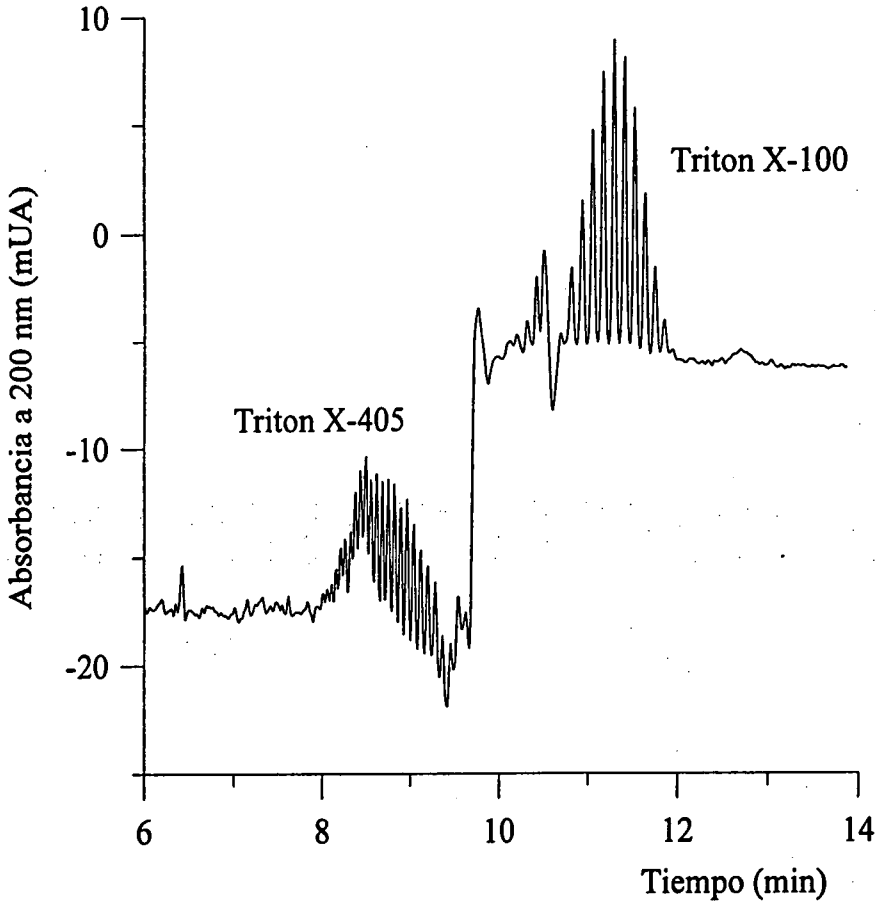


Figura XI.2. Electroferograma de una mezcla de Tritón X-100 y Tritón X-405 (500 μg ml^{-1} cada uno) obtenidos con un BGE conteniendo borato 80 mM a pH 8.5 y 50 mM SDC. El tiempo de migración del EOF fue 4.5 min.

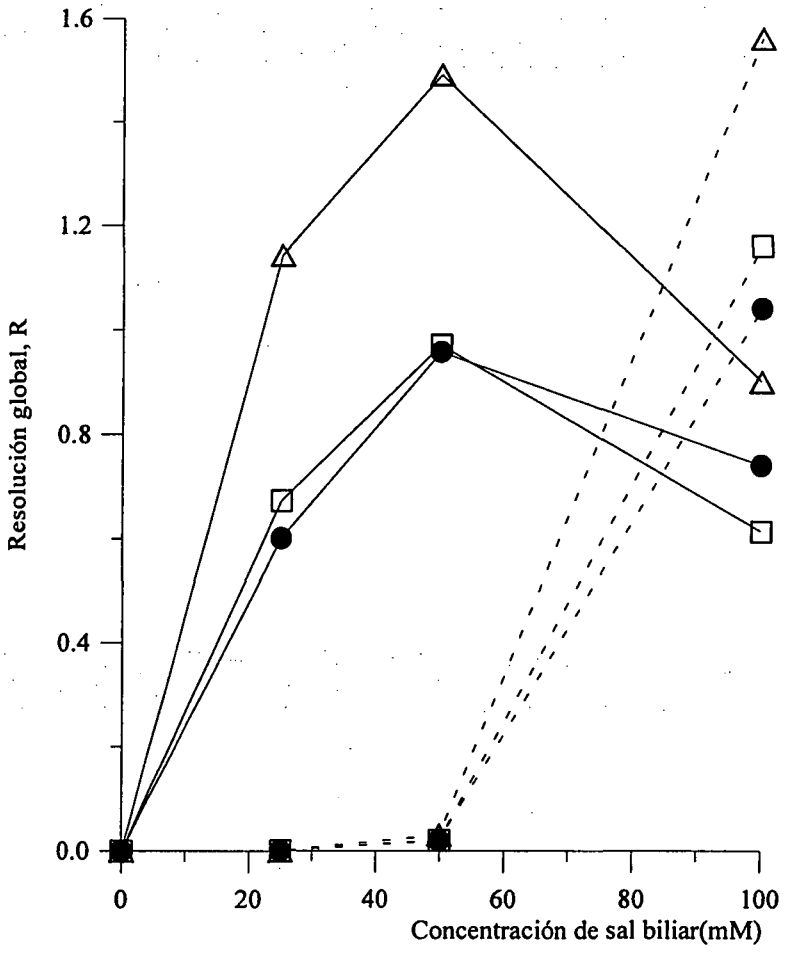


Figura XI.3. Resolución global, R, como la media geométrica de las resoluciones entre picos consecutivos de los tres homólogos más abundantes, frente a la concentración de sal biliar. El BGE contiene borato 80 mM de pH 8.5 y concentraciones crecientes de SC (línea discontinua) o SDC (línea continua). Las disoluciones de prueba fueron: NPE (□), Tritón X-100 (Δ) y Tritón X-405 (●).

Por otra parte, un incremento de la masa molecular de la parte hidrofóbica produce dos efectos opuestos sobre el tiempo de migración del soluto: (i) un incremento debido a una mayor asociación con las micelas, y (ii) una disminución debida a la mayor masa molecular. Experimentalmente, en todos los casos, el NPE con n = 10 exhibió tiempos de migración ligeramente mayores que el correspondiente OPE (Tritón X-100) (en torno a 11.5 min frente 11.8 min para los picos principales). Esto sugiere que para solutos que tengan distinta parte hidrofóbica y el mismo número de unidades de EO, el efecto de la mayor hidrofobicidad predomina ligeramente sobre el efecto de la mayor masa molecular.

Es interesante observar que la resolución entre homólogos se puede alcanzar solo por la acción de la sal biliar, mientras que cuando se emplea SDS es necesaria una elevada concentración de disolvente orgánico. Esto último es habitual en separaciones mediante CZE y MEKC de tensioactivos iónicos o no cargados, en las cuales se necesita una elevada concentración de disolvente orgánico para romper las micelas, permitiendo así a las moléculas de tensioactivo migrar individualmente, sin que puedan formar micelas mixtas. Las micelas mixtas, si se forman, pueden estar constituidas por un número variable de solutos o moléculas huésped, de diferente masa molecular (por ejemplo, diferentes homólogos), y por un número variable de anfitriones o iones de tensioactivo. Normalmente, la separación no es posible si se forman micelas mixtas, debido a esta amplia distribución de cocientes huésped/anfitrión. Por tanto, la separación de los homólogos de los APEs mediante sales biliares, en ausencia de disolventes orgánicos, sugiere la formación de agregados constituidos por una sola molécula de tensioactivo insertada en una pequeña micela de la sal biliar.

Sin embargo, también se estudió la influencia de la adición de un disolvente orgánico al BGE en presencia de sales biliares. Las micelas formadas por las sales biliares pueden tolerar grandes concentraciones de disolventes orgánicos (por ejemplo, 30%) sin que se vea afectada su integridad estructural. Esto es particularmente notable, ya que las micelas de la mayoría de los tensioactivos iónicos y no iónicos se destruyen con porcentajes relativamente bajos de disolvente orgánico. Se usaron BGEs que

contenían 80 mM de tampón borato de pH 8.5, SDC 50 mM y concentraciones crecientes de acetonitrilo o de n-propanol. Como se indica en la Figura XI.4, la resolución mejoró ligeramente con concentraciones moderadas de acetonitrilo, mientras que disminuyó para concentraciones altas de este disolvente. Como también se muestra en la Figura XI.5, la resolución fue aproximadamente la misma con concentraciones moderadas de n-propanol, y disminuyó para concentraciones superiores a un 20% de n-propanol, siendo superior en este caso el tiempo de análisis respecto al obtenido con acetonitrilo. Como se observa comparando las Figuras XI.6 y XI.7 con la Figura XI.2, una importante ventaja del uso de cantidades moderadas de acetonitrilo o de n-propanol es el bajo ruido de fondo de la línea base.

En comparación con otros electroferogramas de la bibliografía [22, 28, 30], la resolución entre los homólogos fue similar para los APEs con número bajo y medio de unidades de EO, sin embargo, se consiguió una mejor resolución para el Tritón X-405, cuyo número de unidades de EO es alto (n = 40). Además, en la Figura XI.7, parte B, se observa como mezclas de APEs con bajo (Tritón X-100, n = 10) y alto número de EO (Tritón X-405, n = 40) pueden ser resueltas con una única inyección.

Además, los picos pequeños alrededor de los 18 min en la Figura XI.7, parte A, corresponden a homólogos de NPE con un número bajo de unidades de EO, y al nonilfenol desetoxilado, y de modo similar, los homólogos de OPE con un número bajo de unidades de EO, y el octilfenol desetoxilado, aparecen próximos a los 19 min en la Figura XI.7, parte B. La resolución de estos picos muestra que el procedimiento puede ser aplicado a la identificación y evaluación de los APs y APEs altamente hidrofóbicos, lo que tiene mucho interés en estudios ambientales.

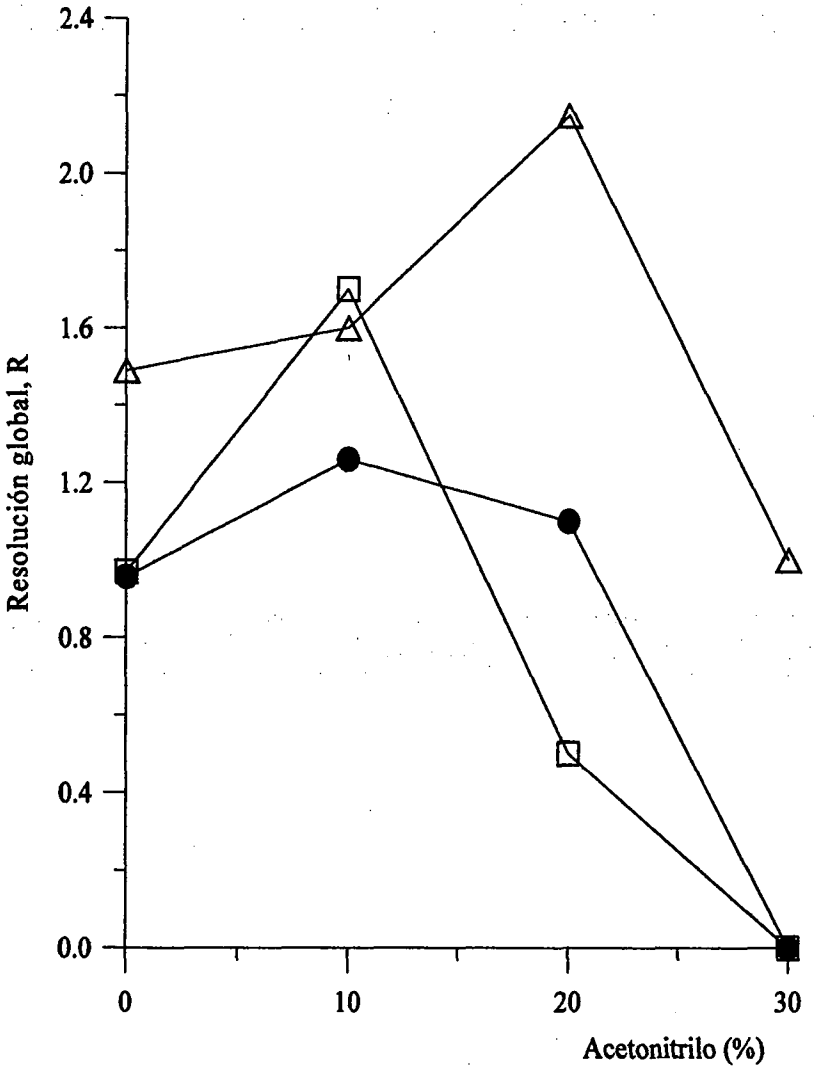


Figura XI.4. Resolución global, R, frente a la concentración de acetonitrilo. El BGE contiene tampón borato 80 mM de pH 8.5, SDC 50 mM y las concentraciones indicadas de acetonitrilo. Símbolos como en Figura XI.3.

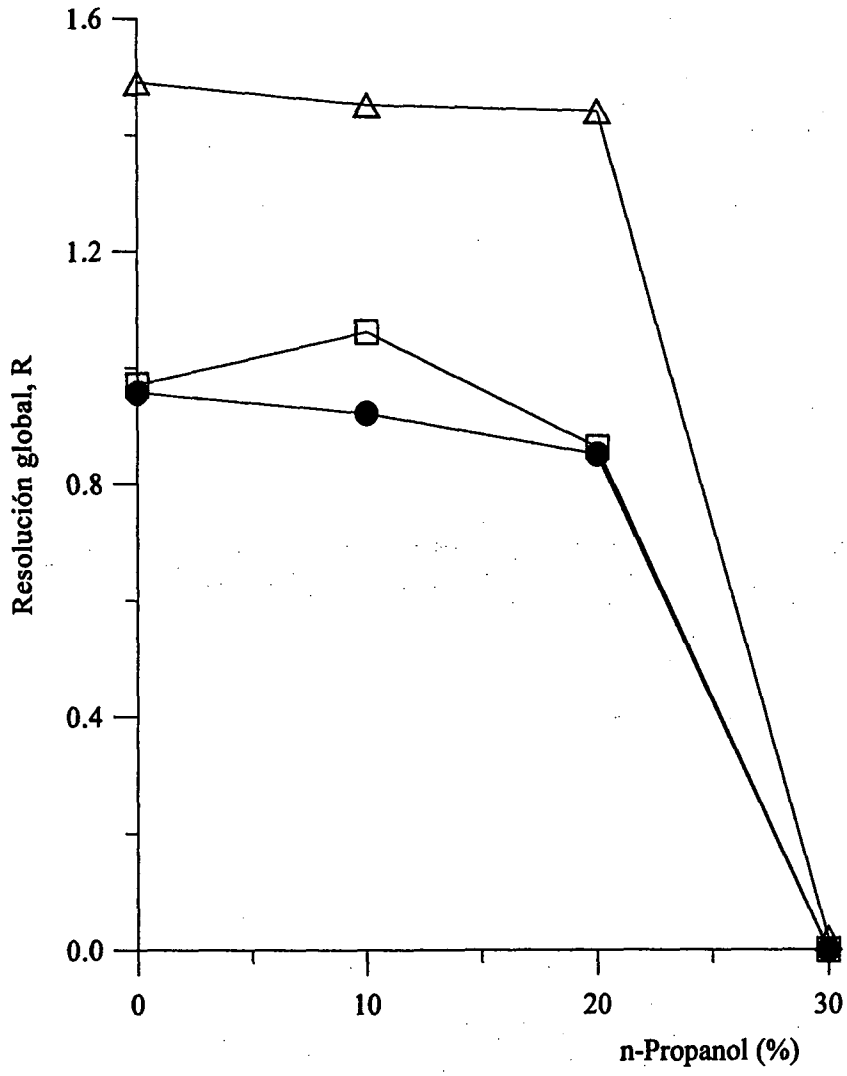


Figura XI.5. Resolución global, R, frente a la concentración de n-propanol. Otras condiciones y símbolos como en Figura XI.4.

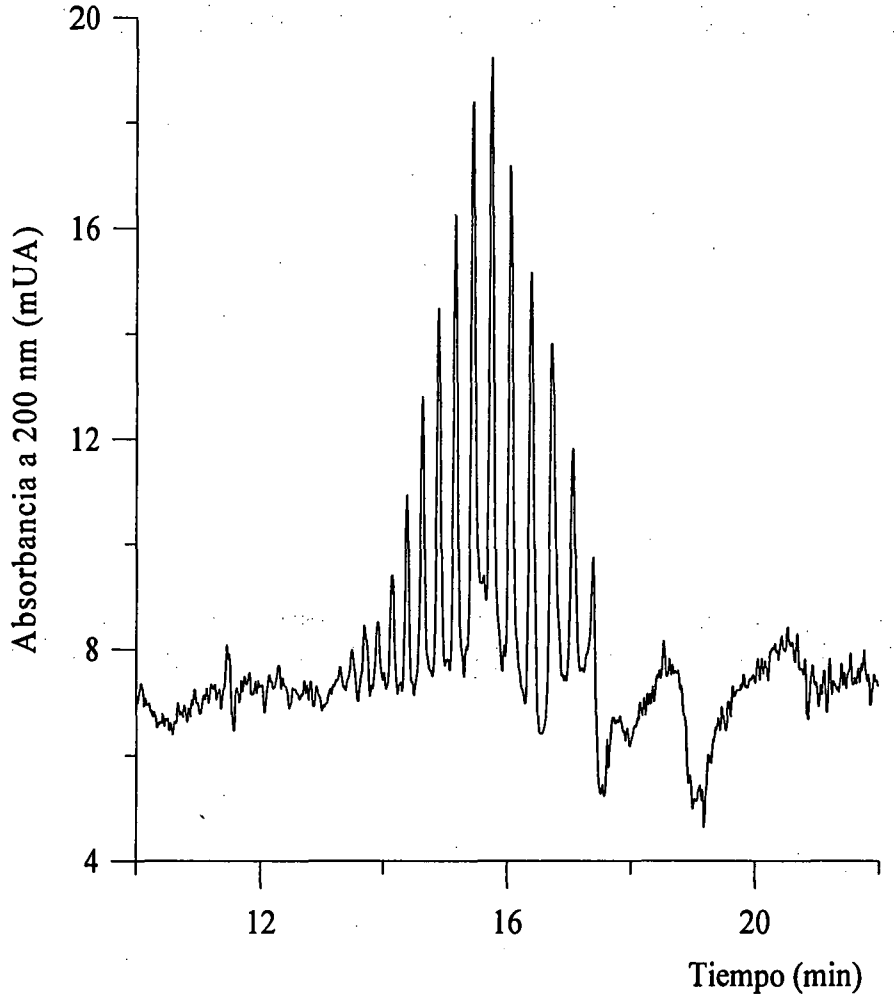


Figura XI.6. Electroferograma de Tritón X-100 (500 μg ml^{-1}) obtenido con un BGE conteniendo tampón borato 80 mM de pH 8.5, SDC 50 mM y un 20% de acetonitrilo.

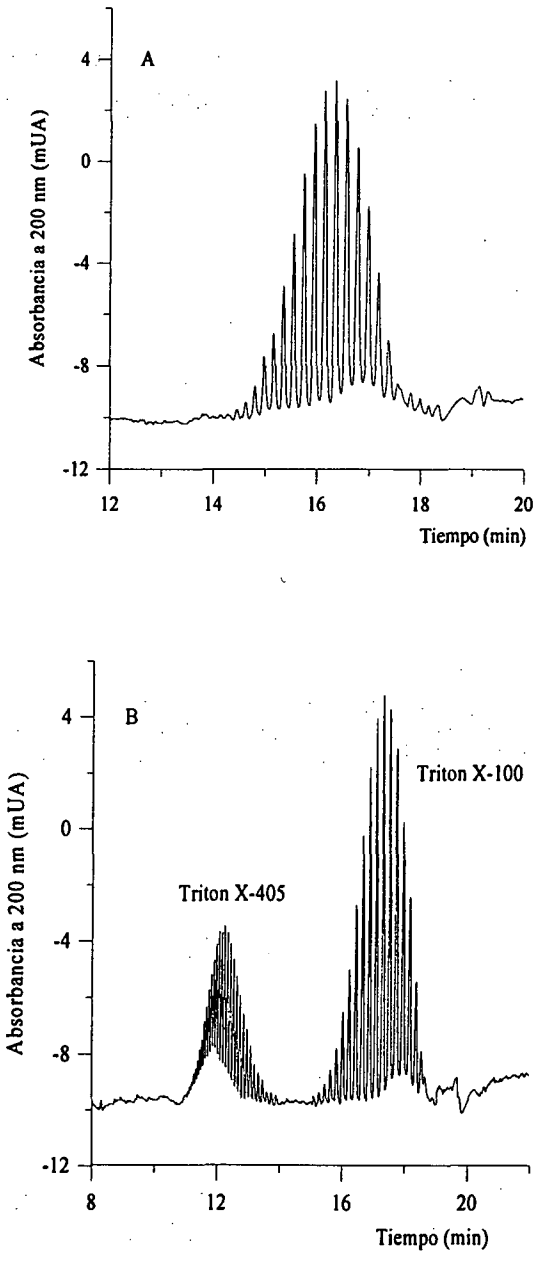


Figura XI.7. Electroferograma de NPE (A) y de una mezcla conteniendo Tritón X-100 y Tritón X-405 (B) (500 μg ml^{-1} cada uno); BGE como en Figura XI.6, pero sin acetonitrilo y con un 10% de n-propanol.

Se estudió la influencia de la presencia de concentraciones crecientes de SDS en BGEs que contenían SDC 50 mM, en ausencia y presencia de un 10% de n-propanol. Los efectos del SDS son: (i) incrementa el tiempo de migración, (ii) también incrementa ligeramente la resolución, hasta una concentración de SDS 20 mM, y (iii) reduce la resolución para NPE y OPE con n = 10 a concentraciones de SDS superiores a 20 mM. Estos tensioactivos son más hidrofóbicos que el Tritón X-405 (con n = 40), y por tanto, se asocian más fuertemente con el SDS. En consecuencia, sus correspondientes homólogos convergen progresivamente hacia un pico único. Este efecto se puede apreciar en la Figura XI.8.

XI.3.2. Análisis de muestras industriales

Se analizaron las muestras industriales indicadas en la Tabla XI.1, que contenían NPE con n = 10 y otros tensioactivos. Con el BGE (i) (usando n-propanol, en ausencia y presencia de SDS 20 mM), los picos de otros tensioactivos (principalmente LAS) solapaban con los picos de NPE, interfiriendo en la evaluación cuantitativa de NPE. La selectividad no mejoró mediante el incremento de la concentración de SDC hasta 100 mM. Posteriormente, la concentración de n-propanol se incrementó también hasta un 30% para diferentes concentraciones de SDC. En presencia de n-propanol, el tiempo de migración de los picos del LAS aumentó considerablemente con respecto a los picos del NPE. La mayor selectividad entre los homólogos de NPE, y simultáneamente, la mayor separación entre los picos del LAS y NPE, se consiguió para un BGE que contenía SDC 75 mM y un 20% de n-propanol. Por ello, en todos los experimentos realizados a continuación se utilizó el BGE (ii), cuya composición se estableció precisamente a partir de estos resultados.

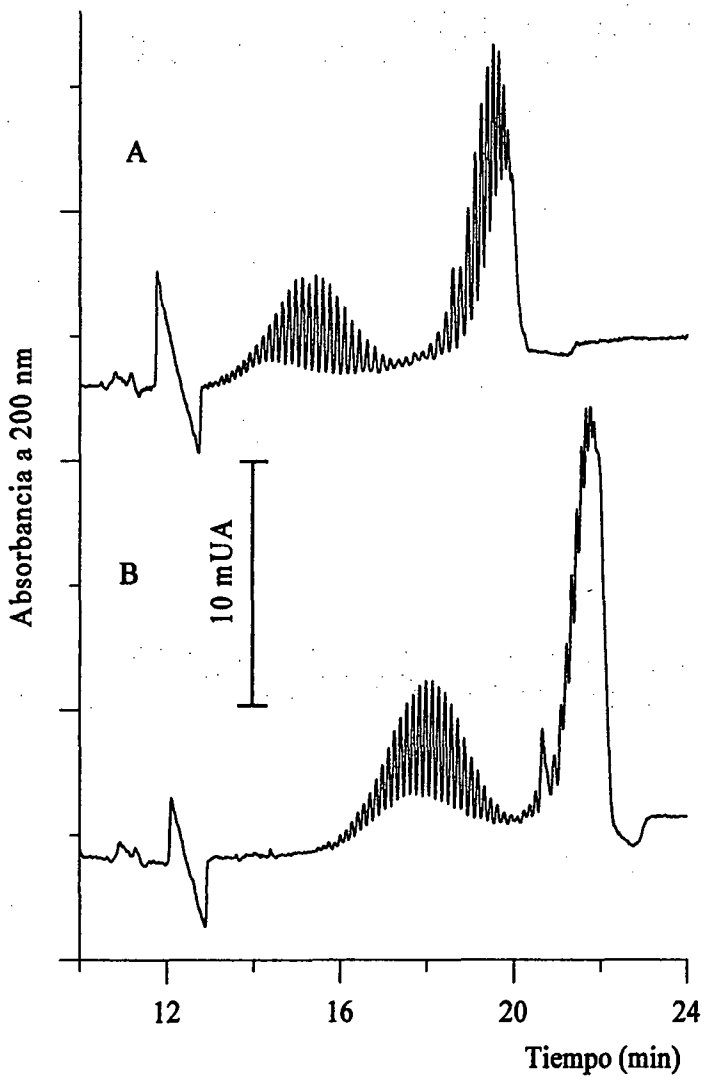


Figura XI.8. Electroferogramas de una mezcla de Tritón X-100 y Tritón X-405 (500 µg ml^{-1} cada uno) obtenidos con un BGE conteniendo tampón borato 80 mM de pH 8.5, SDC 50 mM y las siguientes concentraciones de SDS: (A) 50 y (B) 75 mM.

Tabla XI.1. Análisis de muestras comerciales

Muestras	Declarado, %	Hallado[a], %
Desengrasante industrial ácido	2	1.86 ± 0.08 (1.98)
Limpiador industrial alcalino de superficies	5	4.74 ± 0.11 (5.04)
Desinfectante industrial	5	4.92 ± 0.17 (5.23)
Detergente líquido automáticas	4.9	5.04 ± 0.05 (4.91)
Detergente en gel automáticas (I)	13.6	14.08 ± 0.15 (13.73)
Detergente en gel automáticas (II)	10.9	11.73 ± 0.26 (11.4)
Detergente prendas delicadas	2.4	2.9 ± 0.2 (2.8)
Detergente ropa blanca	4.4	4.52 ± 0.08 (4.41)
Detergente ropa color	6.7	6.80 ± 0.08 (6.63)
Limpiador doméstico amoniacal	0.5	0.51 ± 0.01 (0.50)
Limpiador pulimentador	1.7	1.89 ± 0.14 (1.84)

[a] Valores obtenidos como medias y desviaciones estándar de cinco muestras inyectadas cada una por triplicado; valores referidos al estándar de Fluka, con la media referida al respectivo NPE industrial entre paréntesis (la desviación estándar fue la misma).

Como se muestra en la Figura XI.9, los picos de NPE y LAS se separan muy satisfactoriamente. Aún más, se consigue la resolución parcial de los isómeros y homólogos del LAS. Por otra parte, el pico principal de CODEA está parcialmente solapado con el pico de un homólogo del NPE; sin embargo, esto no dificulta la cuantificación de NPE, ya que el área de este homólogo se puede obtener por interpolación lineal, usando las áreas de los picos de los homólogos restantes. El mismo procedimiento se aplicó para cuantificar tres homólogos del NPE en un producto de limpieza desinfectante, sin que el solapamiento entre estos picos y los debidos a los homólogos del BKC originase error sistemático alguno (Figura XI.10).

Usando este BGE, la región próxima a los 27 min corresponde a los APEs con bajo número de unidades de EO y a los APs desetoxilados, que tienen interés en muestras ambientales. Por tanto, la amplia ventana de tiempo que se extiende entre las regiones de los APEs y del LAS constituye una interesante característica de este BGE, ya que, con frecuencia, estos dos tipos de tensioactivos se investigan en muestras ambientales.

Se obtuvieron curvas de calibración usando los dos NPEs industriales (indicados en la sección XI.2.1) y el estándar de Fluka. Se inyectaron disoluciones de NPE en concentraciones crecientes hasta 3 mg ml^{-1}. El NPE se cuantificó como la suma de las áreas de todos los picos de los homólogos. Para los tres NPEs estudiados, las curvas de calibrado fueron lineales hasta una concentración de 2 mg ml^{-1}. Las sensibilidades se obtuvieron con siete estándares de concentraciones igualmente espaciadas dentro del intervalo dinámico lineal. No se observaron diferencias entre los electroferogramas de los tres NPEs, sin embargo, las pendientes de las tres curvas de calibración difirieron ligeramente, lo cual puede ser debido a diferencias de pureza entre los estándares (por ejemplo, el estándar de Fluka tiene una riqueza del 90%).

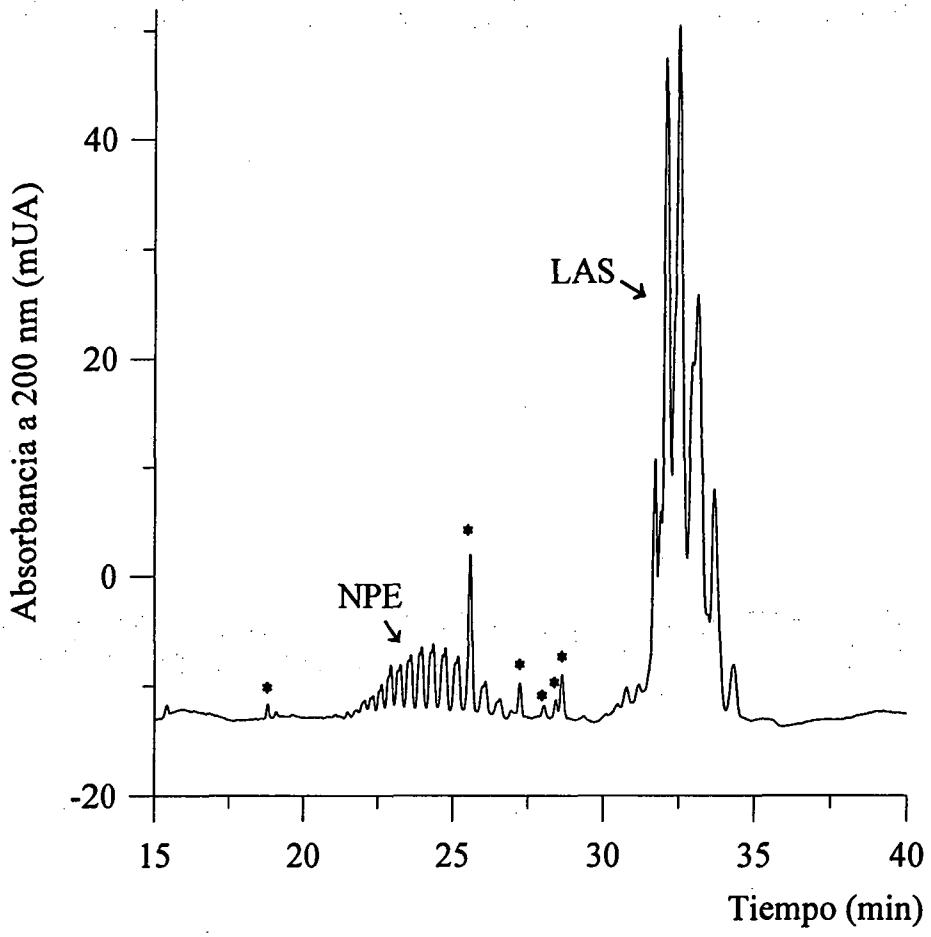


Figura XI.9. Electroferograma de un detergente de prendas delicadas obtenido con el BGE (ii), mostrando los picos de los homólogos de NPE y LAS. Los picos marcados con un asterisco son de CODEA.

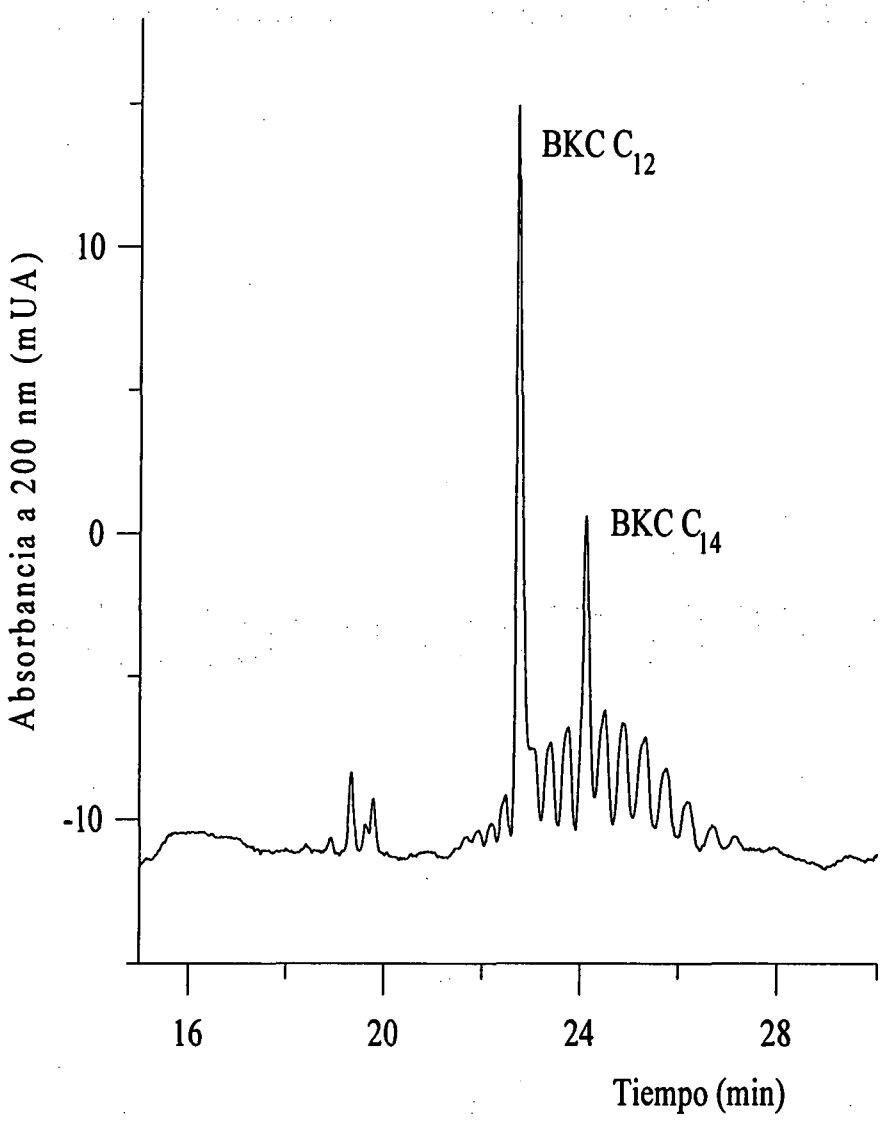


Figura XI.10. Electroferograma de un desinfectante limpiador obtenido con el BGE (ii), mostrando los picos de los homólogos del BKC de 12 y 14 átomos de carbono y los picos de los homólogos del NPE.

Para el análisis de productos industriales, el contenido en NPE se calculó con referencia al estándar de Fluka, sin embargo, para poder comparar el valor de la concentración encontrada con el valor declarado, los valores encontrados fueron también calculados con referencia al mismo NPE industrial empleado por el fabricante para manufacturar el producto. Los resultados de la Tabla XI.1 muestran una concordancia satisfactoria para la amplia variedad de productos analizados.

Los parámetros analíticos significativos se muestran en la Tabla XI.2. Los límites de detección se calcularon para una área igual a tres veces la desviación estándar de las áreas de ocho inyecciones de una disolución de NPE de concentración 50 $\mu g\ ml^{-1}$. El límite de detección de 28 $\mu g\ ml^{-1}$ de NPE total es mejor que otros valores de la bibliografía obtenidos con HPLC y CE con detección UV, por ejemplo, 37 y 100 $\mu g\ ml^{-1}$, respectivamente [22], si bien todos estos límites son mucho mayores que los obtenidos mediante HPLC con detección fluorimétrica (aprox. 0.2 ng ml^{-1}, previa extracción Soxhlet) [18] o con detección mediante espectrometría de masas acoplada (inferior a 1 ng ml^{-1}) [51]. Las repetitividades intra- e inter-día se calcularon a partir de seis series de seis experimentos cada una, llevados a cabo diariamente durante otros tantos días consecutivos. Las repetitividades se evaluaron a dos niveles de concentración de NPE: 50 y 500 $\mu g\ ml^{-1}$.

Tabla XI.2. Parámetros analíticos significativos para el estándar de NPE (Fluka).

Parámetro	Valor
Tiempo de migración intra-día [a]	1.2 %
Tiempo de migración inter-día [b]	4.3 %
Repetitividades de área [a] a 50 $\mu g\ ml^{-1}$	1.7 %
Repetitividades de área [a] a 500 $\mu g\ ml^{-1}$	1.4 %
Repetitividades de área [b] a 50 $\mu g\ ml^{-1}$	5.6 %
Repetitividades de área [b] a 500 $\mu g\ ml^{-1}$	4.9 %
Limite de detección para una relación señal-ruido de 3 (n = 8)	28.4 $\mu g\ ml^{-1}$

[a] Como desviación estándar relativa con 30 grados de libertad (seis series diarias de seis experimentos cada una).

[b] Como desviación estándar relativa de las medias diarias multiplicado por $6^{½}$ (raíz cuadrada del número de valores de las series con las que se obtuvieron las medias) (5 grados de libertad).

XI.4. Conclusiones

Los APEs se pueden separar con excelente resolución entre los homólogos mediante MEKC, con un tampón borato de pH 8.5 que contenga una sal biliar. A una concentración de sal biliar dada, se obtiene mejor resolución con SDC, en relación al uso de SC. En presencia de pequeñas o moderadas concentraciones de disolvente orgánico la línea base mejora notablemente, mientras que la resolución puede mejorar o decrecer ligeramente. Se propone un procedimiento para la determinación de APEs con una resolución óptima entre los homólogos. Este procedimiento proporciona también una huella dactilar del APE, que puede ser usada para determinar el número medio de unidades de EO y otros parámetros útiles en control de calidad, en la caracterización de productos desconocidos, en la monitorización de procesos de degradación, y en estudios de toxicidad y ambientales. También se propone un procedimiento modificado que es más selectivo, y que resulta útil para determinar tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos en productos industriales y domésticos, con una única inyección de la muestra. Los tensioactivos no iónicos, principalmente NPEs, y aniónicos, especialmente LAS, se encuentran habitualmente juntos en productos de limpieza, y por ello, tiene interés la aplicación del procedimiento propuesto en control de calidad. Además, con los dos BGEs recomendados, una región de los electroferogramas resulta ser adecuada para la identificación y evaluación de los APEs de bajo número de grupos de EO y los APs desetoxilados.

XI.5. Referencias

1. APE Research Council, http://www.aperc.org
2. R.J. Maguire,Water Qual. Res. J. Canada, 34 (1999) 37.
3. W. Giger, M. Ahel, M. Koch, H.U. Laubscher, C. Schaffner y J. Schneider, Wat. Sci. Tech., 1987 (1987) 449.
4. W. Giger, P.H. Brunner y C. Schaffner, Science, 225 (1984) 623.
5. S. Jobling y J.P. Sumpter, Aquat. Toxicol., 27 (1993) 361.
6. K.L.E. Kaiser, Water Qual. Res. J. Canada, 34 (1999) 1.
7. T. Schettler, http://www.psr.org/tedfs.htm
8. M.R. Servos, Water Qual. Res. J. Canada, 34 (1999) 123.
9. L. Beaton, http://www.science.mcmaster.ca/Biology/4S03/LB5.HTM
10. S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen y J.P. Sumpter, Environ. Toxicol. Chem., 15 (1996) 194.
11. E.J. Routledge y J.P. Sumpter, Environ. Toxicol. Chem., 15 (1996) 241.
12. S. Steingraber, Environ. Health Persp, 105, supl. 3 (1997) 685.
13. R. White, S. Jobling, S.A. Hoare, J.P. Sumpter y M.G. Parker, Endocrinology, 135 (1994) 175.
14. M.F. Fernandez, V. Pedraza y N. Olea, The Cancer J., 11 (1998) 1, http://www.infobiogen.fr/agora/journals/cancer/articles
15. A.M. Soto, C. Sonnenschein y K.L. Chung, Environ. Health Persp., 103 supl. 7, (1995) 113.
16. S.S. Talmage, Enviromental and Human Safety of Major Surfactants: Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates, CRC/Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994. También disponible en SDA technical monograph, nº cat. L1017LBWF. También disponible en National Technical Information Service (NTIS), U.S. Dept. of Commerce, Springfield, VA, nº pub. 703-605-6000 and 800-553-6847, Microfiche PB94-184983, Vol. 2 Nonionic, 1994. También disponible en http://www.sdahq.org.

17. H.B. Lee, Water Qual. Res. J. Canada, 34 (1) (1999) 3.
18. A. Marcomini y W. Giger, Anal. Chem., 59 (1987) 1709.
19. M. Ahel y W. Giger, Anal. Chem., 57 (1985) 1577.
20. M. Ahel y W. Giger, Anal. Chem., 57 (1985) 2584.
21. A. Marcomini, S. Capri y W. Giger, J. Chromatogr., 403 (1987) 243.
22. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, J. Chromatogr. A, 745 (1996) 281.
23. K. Heinig y C. Vogt Fresenius J. Anal. Chem., 359 (1997) 202.
24. M. Ahel, T. Conrad y W. Giger, Environ. Sci. Technol., 21 (1987) 697.
25. R.A. Wallingford, Anal. Chem., 68 (1996) 2541.
26. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya y T. Ando, Anal. Chem., 56 (1984) 111.
27. S. Terabe, K. Otsuka y T. Ando, Anal. Chem., 57 (1985) 834.
28. J. Bullock, J. Chromatogr., 645 (1993) 169.
29. C. Vogt y K. Heinig, Tenside Surf. Det., 35 (1998) 470.
30. K. Heinig,C. Vogt y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 357 (1997) 695.
31. M.G. Khaledi, J. Chromatogr. A, 780 (1997) 3.
32. P.G. Muijselaar, K. Otsuka y S. Terabe, J. Chromatogr. A, 780 (1997) 41.
33. S. Terabe, Trends Anal. Chem., 8 (1989) 129.
34. H. Nishi, F. Tsukasa, M. Matsuo y S. Terabe, J. Chromatogr., 498 (1990) 313.
35. R. Cole, M. Sepaniak, W. Hinze, J. Gorse y K. Oldiges, J. Chromatogr., 557 (1991) 113.
36. A. Citterio, R. Sebastiano y D. Lucchini, Separation of quaternary alkylammonium salts by MEKC, 11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, 4-7 Octubre 1998, Venecia, Italia.
37. J.G. Bumgarner y M.G. Khaledi, J. Chromatogr. A, 738 (1996) 275.
38. J.G. Clothier Jr., L. Daley, y S.A., Tomellini, J. Chromatogr. B, 683 (1996) 37.
39. J.G. Clothier Jr., y S.A. Tomellini, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 179.

40. D.M. Small, The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism, Plenum Press, Nueva York, 1971, Cap.8, pág. 249.

41. D.M Small, Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser., 84 (1968) 31.

42. D.M. Small, S.A. Penkett y D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta, 176 (1969) 178.

43. G. Conte, R. Di Blasi, E. Giglio, A. Paretta y N.V. Pavel, J. Phys. Chem., 88 (1984) 5720.

44. G. Esposito, E. Giglio, A. Paretta y A. Zanobi, J. Phys. Chem., 91 (1987) 356.

45. A.R. Campanelli, E. De Sanctis, E. Chiessi, M. D'Alagni, E. Gigli y L. Scaramuza, J. Phys. Chem., 93 (1989) 1536.

46. A. Coello, F. Meijide, E. Rodríguez-Nuñez y J. Vázquez-Tato, J. Pharm. Sci., 85 (1996) 9.

47. H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo y S. Terabe, J. Chromatogr. ,515 (1990) 233.

48. R. Cole, M. Sepaniak y W. Hinze, J. High Resolut. Chromatogr., 13 (1990) 579.

49. S. Terabe, H. Nishi, T. Fukuyama y M. Matsuo, J. Microcol. Separ., 1 (1989) 234.

50. J.M. Herrero-Martínez, E.F. Simó-Alfonso, C. Mongay-Fernández y G. Ramis-Ramos, J. Chromatogr. A, 895 (2000) 227.

51. K.A. Evans, S.T. Dubey, L. Kravetz, I. Dzidic, J. Gumulka, R. Mueller y J.R. Stork, Anal. Chem., 66 (1994) 699.

XII. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ALQUILBENCENO SULFONATOS LINEALES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL EN MEDIO NO ACUOSO Y EN PRESENCIA DE SALES DE ALQUILAMONIO

CAPÍTULO XII

SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ALQUILBENCENO SULFONATOS LINEALES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL EN MEDIO NO ACUOSO Y EN PRESENCIA DE SALES DE ALQUILAMONIO

Enviado para su publicación en Electrophoresis.

Resumen

Se ha desarrollado un procedimiento para separar alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS) mediante electroforesis capilar en medio no acuoso en presencia de alquilaminas y ácido acético. En un medio etanol, se han comparado diferentes alquilaminas (primarias, secundarias y terciarias) de diferente hidrofobicidad. Los solutos migran en contra del flujo electroosmótico (EOF), y al mismo tiempo son frenados debido a la asociación con las moléculas de alquilamina presentes o por sus correspondientes iones alquilamonio. La mejor resolución entre homólogos de LAS se obtuvo con un ligero exceso de dipentilamina sobre ácido. Cuando la concentración del tampón aumentó, la resolución entre homólogos aumentó ligeramente, sin embargo se aprecia una aumento notable en la resolución parcial de isómeros. Un BGE conteniendo 10 mM de ácido acético y 20 mM de dipentilamina fue usado para separar y cuantificar los homólogos en un tiempo inferior a 25 min, mientras que otro conteniendo 80 mM de ácido acético y 90 mM de dipentilamina ofreció la mejor separación a nivel de isómeros. El primer BGE se aplicó a la caracterización y determinación de LAS en detergentes líquidos y en polvo. El límite de detección para la determinación de LAS total fue 2.5 $\mu g\ ml^{-1}$, y las reproducibilidades de las áreas y tiempos de migración inter-día fueron inferiores al 4.3 y 2.8%, respectivamente.

Palabras clave: alquilbenceno sulfonatos lineales; electroforesis capilar en medio no acuoso; asociación iónica con sales de alquilamonio

XII.1. Introducción

Los alquilbenceno sulfonatos lineales (LAS) son los tensioactivos aniónicos más ampliamente utilizados en la industria de los detergentes. Se encuentran en productos domésticos e industriales de limpieza, incluyendo limpiadores de superficies. Los LAS son también empleados en las industrias textil, cosmética, alimentaria y del cuero, y en la flotación de minerales [1]. Los LAS están presentes en las formulaciones comerciales como mezclas complejas de los homólogos C_{10} a C_{14}, cada uno de los cuales puede encontrarse como diversos isómeros posicionales. Los isómeros posicionales se distinguen unos de otros por el carbono de la cadena alquílica al que se encuentra unido el grupo bencénico, y que puede variar desde el segundo hasta el central [2].

La determinación del contenido total de LAS es suficiente para la legalización del producto, y como valoración general de su posible impacto en contaminación de aguas residuales y superficiales. Sin embargo, la caracterización de los LAS, que implica establecer su perfil en homólogos e isómeros, es también importante en relación con muestras industriales y ambientales. La detergencia, la biodegradabilidad y la toxicidad en medio acuático dependen de la longitud de la cadena alquílica y de la posición del anillo aromático. Además, la distribución en homólogos e isómeros proporciona información acerca del proceso de fabricación y puede ser usado como huella dactilar para establecer el origen del producto. Por tanto, se requieren métodos analíticos selectivos, sensibles y fiables tanto en control de calidad de los productos, como en análisis ambiental.

El método más ampliamente utilizado para la cuantificación del contenido total de tensioactivos aniónicos, incluyendo los LAS, en muestras acuosas es el método estándar del azul de metileno [3]. Se ha llevado a cabo la determinación selectiva de LAS mediante GC [4], HPLC [5], espectrometría de masas [6], TLC en combinación con espectroscopia IR y UV [7], NMR [8] o potenciometría [9], y electroforesis [10]. La HPLC de intercambio iónico es ineficaz para separar los homólogos e isómeros del LAS [11]. Con este fin, habitualmente se utiliza la HPLC de fase inversa con fases estacionarias del tipo C_{18} [12,13] o C_8 [14], y fases móviles conteniendo perclorato sódico.

En los últimos años, se ha incrementado considerablemente el uso de la CE para la caracterización y separación de tensioactivos [15-24]. Los homólogos e isómeros de LAS no se resuelven utilizando BGEs en ausencia de disolvente orgánico [18, 20]. No obstante, bajo estas condiciones, la CZE puede ser útil para la determinación del contenido total de LAS [18, 20]. La separación de homólogos se puede conseguir mediante la adición de una concentración elevada de disolvente orgánico al BGE (por ejemplo, un 30% de CH_3CN) [15-18]. La resolución también se puede mejorar mediante la adición de Mg^{+2} al BGE [19]. Por otro lado, la resolución de isómeros requiere un mecanismo de separación adicional, tal como la asociación solvofóbica con SDS [16, 21] o la presencia de interacciones anfitrión-huésped con ciclodextrinas [20, 24], todo ello en presencia de disolvente orgánico. La separación de isómeros también se puede llevar a cabo utilizando MEKC en presencia de SDS y CH_3CN [16].

Recientemente, la técnica de la CE en medio no acuoso (NACE, *non-aqueous capillary electrophoresis*) ha cobrado un creciente interés [25-27]. Compuestos altamente hidrofóbicos se pueden ser disolver y separar con BGEs no acuosos. En estos medios, las especies neutras hidrofóbicas se separan por asociación con aditivos cargados [25]. Además, la NACE permite evitar los fenómenos de adsorción sobre la pared del capilar y/o las interacciones ion-ion, que provocan la precipitación de los solutos (por ejemplo, los tensioactivos aniónicos con cationes metálicos). Salimi-Moosavi y col. [27-28] mostraron la importancia de las interacciones ion-ion para ajustar la selectividad en NACE, utilizando para ello cationes metálicos o sales de alquilamonio para separar LAS y otros tensioactivos aniónicos. Los homólogos de LAS también han sido separados (si bien, no cuantificados) en metanol puro empleando tetrametilamonio como contraión [28].

En este Capítulo, se estudia la separación de homólogos de LAS mediante la técnica NACE empleando un tampón constituido por ácido acético y una alquilamina en medio etanol. A su vez, se comparan diferentes alquilaminas (primarias, secundarias y terciarias) de diferente hidrofobicidad. El procedimiento optimizado fue aplicado al análisis de LAS en varios productos comerciales de limpieza.

XII.2. Parte experimental

XII.2.1. Reactivos y muestras

Los estándares de LAS, conteniendo cantidades certificadas de los homólogos de 10 a 13 átomos de carbono, se obtuvieron de Petresa (San Roque, Cádiz) y Condea (Marl, Alemania). Las disoluciones usadas como estándar para los estudios de optimización contenían 2 mM de LAS en agua. Se utilizó ácido bencenosulfónico (Fluka, Buchs, Suiza) como estándar interno. Se usaron las siguientes alquilaminas, todas ellas de Fluka: n-etil, n-propil, n-butil, n-pentil, n-hexil, n-heptil, dietil, dipropil, dibutil, dipentil, dihexil, trietil, tripropil, tributil y tripentil aminas. Se usaron también ácido clorhídrico y ácido acético de grado analítico (Panreac, Barcelona), ácidos fórmico, n-propiónico y n-butírico (Fluka), etanol y acetonitrilo de grado HPLC (Scharlau, Barcelona) y agua desionizada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA). Los productos domésticos e industriales de limpieza fueron suministrados por Químicas Oro, S.A. (San Antonio de Benagéber, Valencia).

XII.2.2. Instrumentación

Se utilizó un sistema de electroforesis capilar HP^{3D} (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector espectrofotométrico de fila de diodos y capilares de sílice fundida (Supelco, Bellefonte, PA, USA) de longitud total 33.5 cm (25 cm longitud efectiva) × 50 μm I.D. (363 μm O.D.). Las medidas del pH aparente en etanol fueron realizadas con un potenciómetro Crison modelo micropH 2000 provisto de un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl a la temperatura de 23°C.

XII.2.3. Procedimientos

Antes de cada sesión, el capilar se acondicionó con el tampón de separación durante 60 min, y entre inyecciones sucesivas durante 5 min. Cuando se cambió la composición del BGE, el capilar se lavó con NaOH 0.1 M durante 30 min, y con el nuevo BGE por 30 min más. Las muestras se disolvieron directamente en agua, o se diluyeron con agua desionizada; cuando fue necesario se trataron previamente con un pequeño volumen de etanol. Todas las disoluciones se hicieron pasar a través de filtros de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro (MSI, Westboro, MA, USA). Se realizó inyección hidrodinámica aplicando 50 mbar durante 2 s. El voltaje aplicado fue 25 kV con polaridad negativa. La detección se realizó a 224 nm.

XII.3. Resultados y discusión

XII.3.1. Selección del ácido y la amina

En presencia de altos porcentajes de disolvente orgánico, así como en medio puramente orgánico, el bajo potencial ζ conduce a valores muy pequeños del EOF [26, 29, 30]. Por tanto, para separar aniones como los LAS en este medio, se debe trabajar con polaridad invertida. Se realizaron estudios previos con disoluciones de ácidos carboxílicos alifáticos (fórmico, acético, propiónico y butírico) y HCl, todos ellos en concentración 10 mM en etanol no acuoso. El ácido acético proporcionó los menores valores de corriente, y una mejor resolución entre los picos C_{10} y C_{13}, respecto al uso del HCl. A su vez, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes ácidos carboxílicos ensayados, seleccionándose por tanto el ácido acético para estudios posteriores. En la Figura XII.1 se muestra un electroferograma obtenido con ácido acético 10 mM.

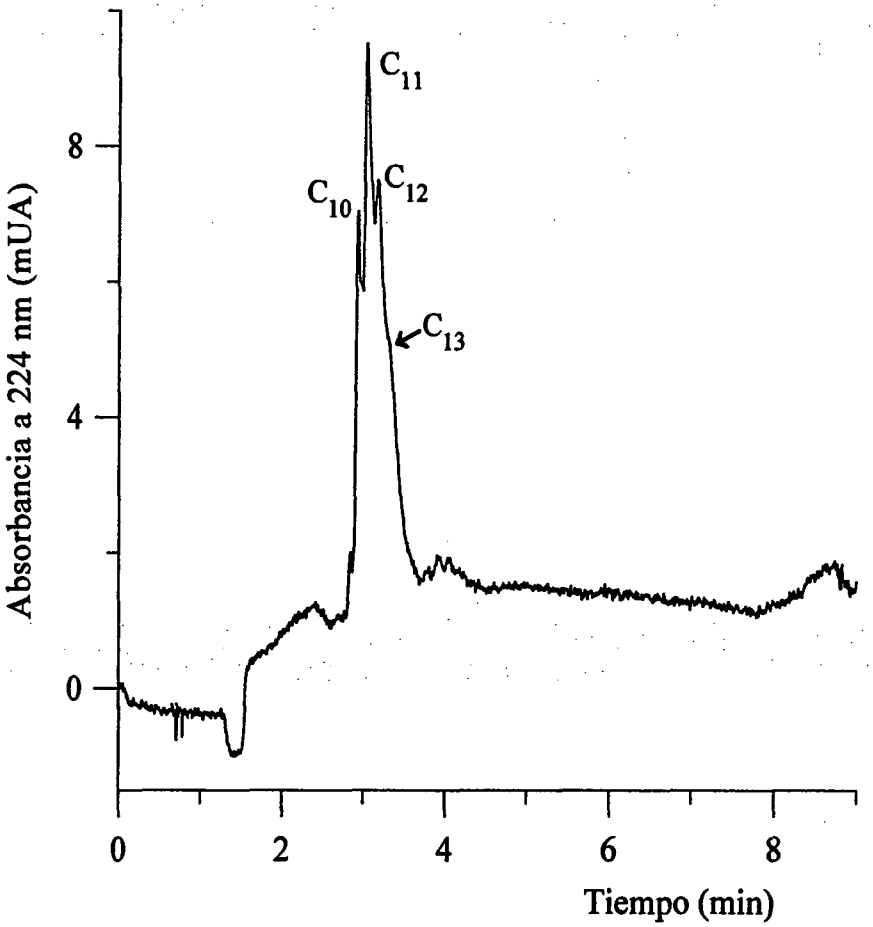


Figura XII.1. Electroferograma de LAS 2 mM en un BGE conteniendo ácido acético 10 mM en etanol. Capilar de 33.5 cm × 50 µm I.D.; inyección hidrodinámica a 50 mbar × 2 s; voltaje aplicado, 25 kV con polaridad negativa; detección a 224 nm.

La selectividad en sistemas no acuosos puede ser manipulada mediante el empleo de agentes formadores de pares iónicos con diferentes propiedades estéricas e hidrofóbicas. Con el objeto de incrementar la resolución a través de la modificación de la selectividad, se estudiaron diversas alquilaminas lineales primarias, secundarias y terciarias, variando además la longitud de la cadena alquílica. Los experimentos se realizaron en el medio alcalino, utilizando ácido acético 10 mM y alquilamina 20 mM. Los resultados se muestran en la Figura XII.2. El tiempo de migración aumenta con la longitud de la cadena, y también con el número de cadenas de la amina, es decir al pasar de las aminas primarias a las secundarias y terciarias, lo que puede ser debido a una asociación de las aminas más hidrofóbicas más fuerte con los solutos, o también, a la mayor masa molecular de los pares iónicos formados.

A lo largo de cada serie se observa una mayor separación de las líneas de los homólogos con C_{10} (línea continua) y C_{13} (línea discontinua o de trazos), indicando que una mayor hidrofobicidad (y tamaño molecular) de la amina tiende a mejorar la resolución entre homólogos. Este resultado se puede observar también en la Figura XII.3, en la que se representa la resolución global, evaluada como la media geométrica de los siguientes tres pares de picos: C_{10}/C_{11}, C_{11}/C_{12} y C_{12}/C_{13} (usando el pico principal del homólogo, en todos los casos) versus el número de átomos de carbono para cada serie de aminas. Con aminas secundarias y terciarias, se consigue una resolución parcial de los isómeros, como se puede apreciar en la Figura XII.4, parte A, para la dipentilamina. La resolución a nivel de isómeros se incrementa en el orden: dibutilamina< dipentilamina< dihexilamina. Sin embargo, y debido a la falta de reproducibilidad en los tiempos de migración observada tanto con la dihexilamina, así como con la tributilamina y tripentilamina, se seleccionó la dipentilamina para todo el trabajo posterior.

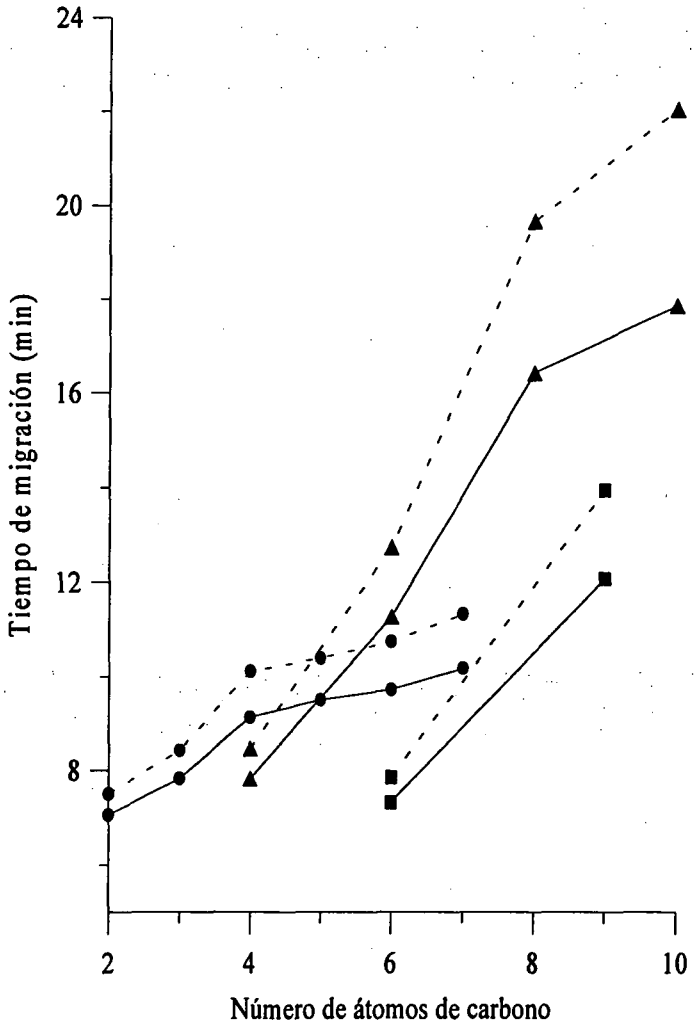


Figura XII.2. Efecto de la naturaleza de la amina sobre el tiempo de migración de los LAS. BGE: ácido acético 10 mM, alquilamina 20 mM en etanol. Las condiciones de trabajo son las indicadas en la Figura XII.1. La línea continua indica los tiempos de migración del homólogo C_{10} y la línea discontinua, los tiempos de migración del homólogo C_{13}. Los símbolos indican aminas primarias (●), secundarias (▲) y terciarias (■).

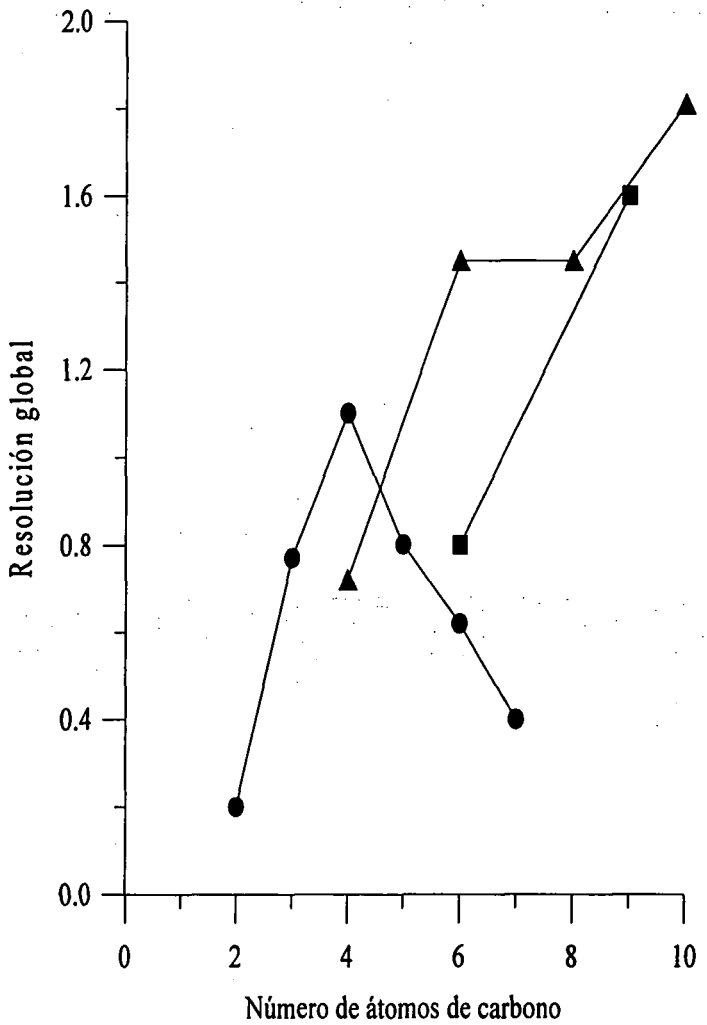


Figura XII.3. Efecto de la naturaleza de la amina sobre la resolución entre homólogos. Símbolos: aminas primarias (●), secundarias (▲) y terciarias (■). BGE: 10 mM ácido acético, 20 mM de alquilamina en etanol. Las condiciones de trabajo son las indicadas en la Figura XII.1.

XII.3.2. Influencia de las concentraciones de ácido y amina

En la Figura XII.4 se muestra la influencia de la concentración del tampón para la serie realizada con un exceso de 10 mM de dipentilamina sobre el acetato de alquilamonio formado. Para valores bajos de concentración (ácido acético 10 mM y dipentilamina 20 mM, o tampón 10/20) se observa una excelente resolución entre homólogos, y una resolución parcial de los isómeros. A medida que se incrementa la concentración del tampón (hasta una relación 80/90 para ácido acético y dipentilamina, respectivamente) aumenta también el tiempo de migración y mejora ligeramente la resolución entre homólogos. Por otro lado, la selectividad de la separación de isómeros está fuertemente influenciada por la concentración del tampón. Para el tampón 10/20, los isómeros correspondientes al homólogo C_{13} aparecen como dos hombros a cada lado del pico principal del homólogo, y lo mismo se observa para los isómeros pertenecientes a los homólogos C_{12} y C_{10} para los tampones 20/30 y 40/50, respectivamente. Así pues, para cada homólogo, la resolución entre el grupo principal de isómeros y uno de los dos grupos secundarios mejora en función de la concentración del tampón.

Al aumentar la concentración del tampón, desde la relación 10/20 hasta 80/90, el pH aparente disminuye ligeramente de 9.2 a 8.7. Esta reducción del pH como el aumento de la fuerza iónica trabajan en el mismo sentido, reduciendo el potencial zeta, y por tanto, disminuyendo el EOF. Los valores del EOF se midieron utilizando polaridad positiva y dimetilformamida y tiourea como marcadores. Con los tampones 10/20 y 80/90, se obtuvieron tiempos de migración de los marcadores de 10.0 ± 0.5 y 16.1 ± 0.9 min ($n = 4$), respectivamente, confirmando la reducción del EOF entre ambos tampones.

Sin embargo, como se observa en la Figura XII.4, los picos de LAS se retrasan. Los mayores tiempos de migración, así como la diferente selectividad de isómeros, se explican suponiendo que el efecto de la reducción del EOF queda superado con creces por una interacción mucho más fuerte entre los solutos aniónicos y los componentes del sistema alquiamina/alquilamonio.

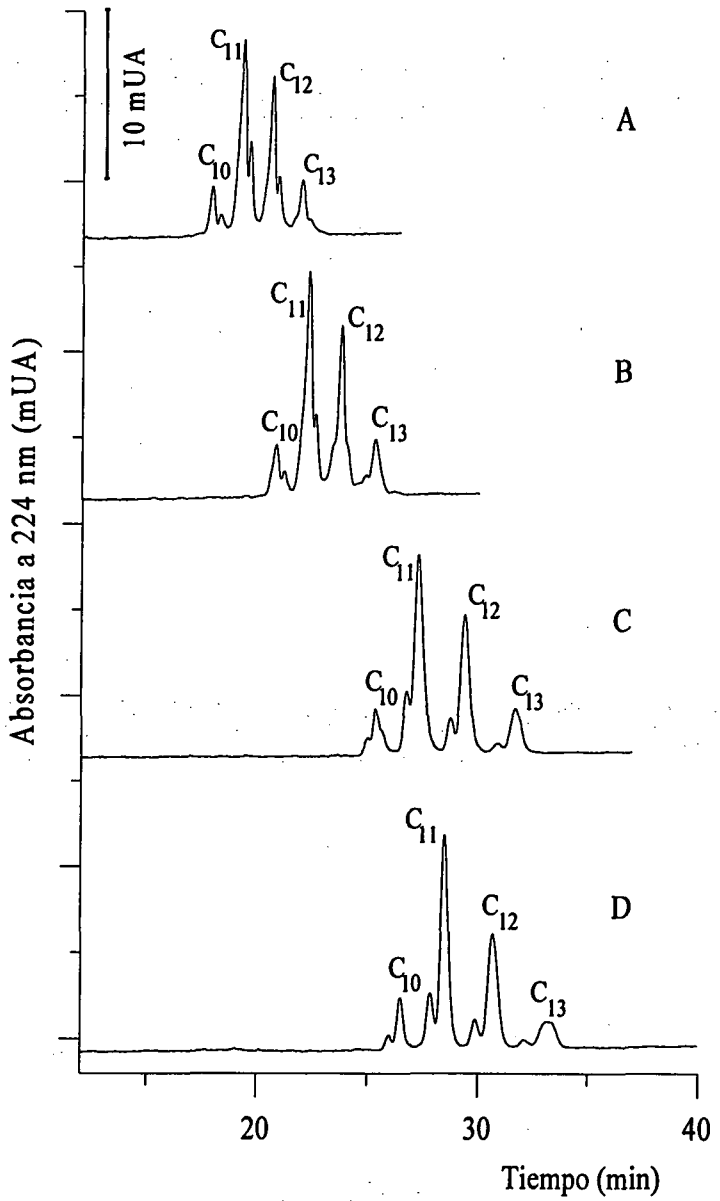


Figura XII.4. Electroferogramas de LAS 2 mM. El BGE contiene etanol y las siguientes concentraciones ácido acético/dipentilamina: (A) 10/20, (B) 20/30, (C) 40/50, y (D) 80/90 mM. Las condiciones de trabajo son las indicadas en Figura XII.1.

A continuación, se trabajó con concentraciones equimoleculares de ácido acético y dipentilamina. Como se muestra en la Figura XII.5, la resolución fue deficiente para el tampón de composición 10/10, y mejoró al aumentar la concentración del mismo hasta el valor 80/80. El pH aparente se mantuvo constante a lo largo de la serie, obteniéndose un valor de 8.7 para los tampones 10/10 y 80/80.

Como anteriormente hemos comentado, también a lo largo de esta serie debe reducirse el EOF, puesto que aumenta la fuerza iónica, lo cual conduciría a una disminución en los tiempos de migración del LAS. Sin embargo, el efecto opuesto se observa en la Figura XII.5. Tanto este retraso en los tiempos de migración como la mejora en la resolución, puede atribuirse al aumento de las interacciones de los solutos con los componentes del tampón a lo largo de la serie. Sin embargo, la resolución con el tampón 80/80 (Figura XII.5, parte D), fue peor que la observada con exceso de alquilamina (tampón 80/90, Figura XII.4, parte D).

En la Figura XII.6 se muestra la serie obtenida incrementando la concentración del tampón en exceso de ácido, desde 20/10 a 90/80. De nuevo, se observa un incremento en los tiempos de migración de los analitos conforme aumenta la concentración del tampón. La mejor resolución fue obtenida con el tampón de mayor concentración, sin embargo, la resolución fue peor en comparación con las series anteriores. A lo largo de la serie (desde 20/10 a 90/80), el pH aparente aumento ligeramente desde 7.4 hasta 8.6. Por tanto, es de esperar un aumento del EOF, que puede venir contrarrestado por el incremento de la fuerza iónica. El EOF se midió con los dos marcadores anteriormente indicados. No se observó pico alguno para el tampón 20/10 para tiempos superiores a los 60 min, tanto en polaridad positiva como negativa, mientras que con el tampón 90/80 y polaridad positiva, el marcador apareció a los 23.1 ± 0.5 min ($n=4$), confirmando el aumento del EOF esperado. Por tanto, a diferencia de lo observado con los otros medios, el retraso observado de los picos de los LAS puede deberse tanto al aumento del EOF, como a la fuerte interacción entre los solutos y los componentes del sistema tampón.

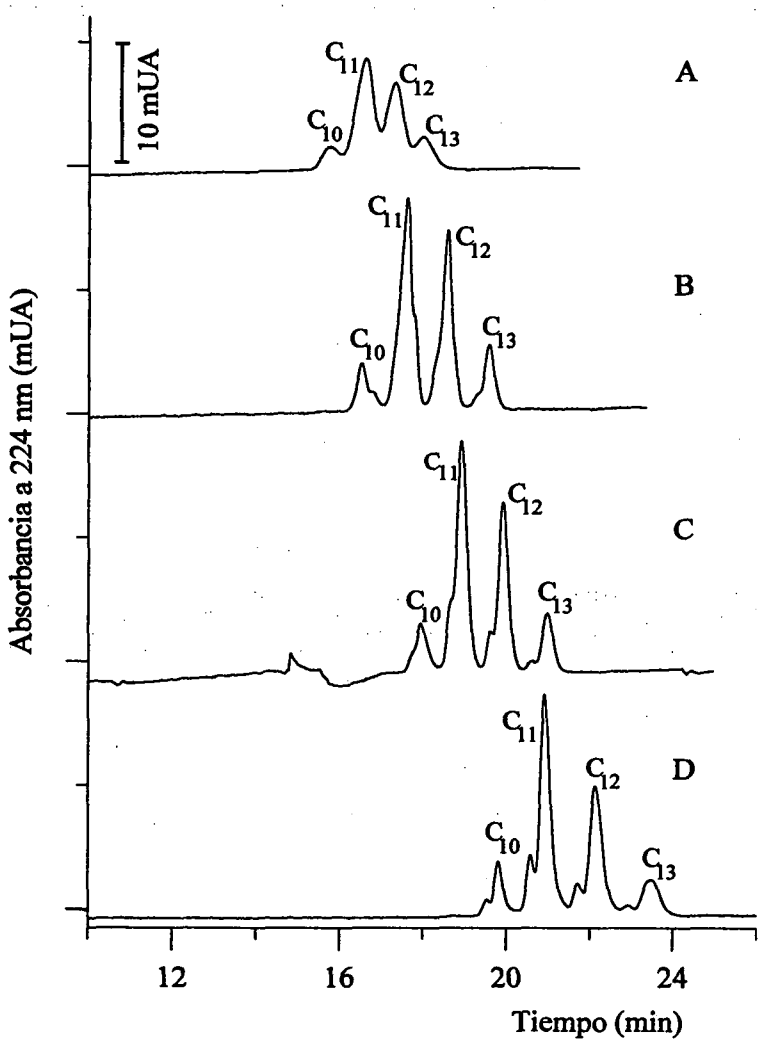


Figura XII.5. Electroferogramas de LAS 2 mM. El BGE contiene etanol y las siguientes concentraciones ácido acético/dipentilamina: (A) 10/10, (B) 20/20, (C) 40/40, y (D) 80/80 mM. Las condiciones de trabajo son las indicadas en Figura XII.1.

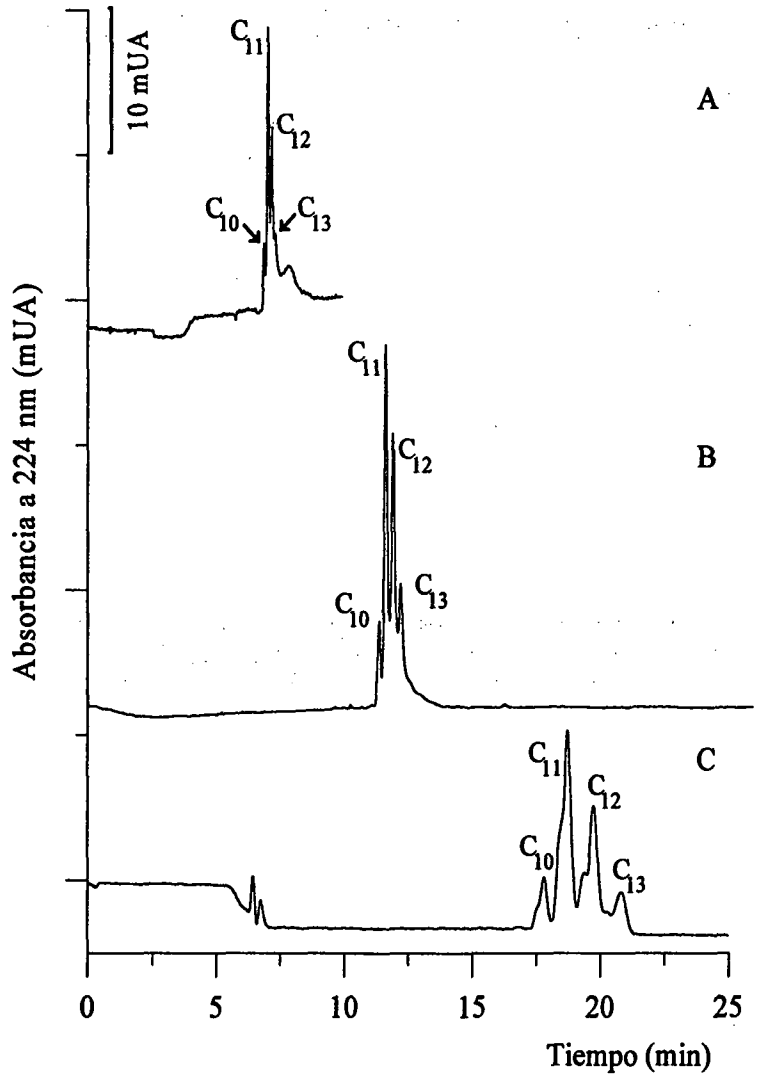


Figura XII.6. Electroferogramas de LAS 2 mM. El BGE contiene etanol y las siguientes concentraciones ácido acético/dipentilamina: (A) 20/10, (B) 50/40 y (C) 90/80 mM. Condiciones de trabajo indicadas en Figura XII.1.

A continuación, se realizó una serie de BGEs conteniendo 80 mM de ácido acético y un exceso creciente de dipentilamina, empleándose las siguientes proporciones: 80/90, 80/200 y 80/400. A lo largo de esta serie, el pH aparente aumentó (de 8.7 a 10) así como la concentración de moléculas de alquilamina libres (sin modificarse la concentración de los iones alquilamonio). Los electroferogramas mostraron una progresiva disminución del tiempo de migración del LAS con importantes pérdidas de resolución. Esto puede atribuirse a la reducción del EOF producida por la adsorpción del exceso de dipentilamina sobre las paredes del capilar. Finalmente, se estudiaron BGEs conteniendo una relación 80/80 ácido acético/dipentilamina, en presencia de pequeñas cantidades de NaOH (hasta 8 mM), produciéndose una disminución en los tiempos de migración del LAS así como una pérdida en la resolución.

XII.3.3. Estudios realizados con mezclas etanol-acetonitrilo

Debido a cambios en la solvatación de analitos y en las interacciones ion-ion, los cambios en la composición del disolvente no acuoso conlleva cambios de selectividad [26, 27].

Se utilizaron mezclas de etanol con las siguientes concentraciones de acetonitrilo: 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 75%. Para asegurar tiempos de migración bajos, la composición del tampón se mantuvo en la relación ácido acético 10 mM y dipentilamina 20 mM.

Un aumento en la concentración de acetonitrilo produce un aumento del EOF, y consiguientemente, produjo una reducción de los tiempos de migración. Para concentraciones superiores a un 20% v/v de acetonitrilo, la movilidad electroosmótica superó a la movilidad electroforética de los LAS, impidiendo su observación. Para concentraciones de acetonitrilo superiores al 25%, los picos de los LAS se observaron usando polaridad positiva, siendo el tiempo de migración de unos 20 min.

Sin embargo, en todos los casos la resolución fue inferior que en ausencia de acetonitrilo.

XII.3.4. Parámetros analíticos significativos

Las repetitividades de los tiempos de migración y áreas de los picos, y los límites de detección de los homólogos y de LAS total se obtuvieron con el BGE constituido por ácido acético 10 mM y dipentilamina 20 mM en etanol, ya que proporciona una resolución óptima entre los homólogos con un tiempo de análisis corto (20 min). Para evaluar las repetividades se utilizó una disolución de 75 $\mu g\ ml^{-1}$ de LAS (Petresa); las repetitividades intra- e inter-día se calcularon a partir seis series de seis experimentos inyectadas a razón de una serie por día, durante días consecutivos. Se construyeron las curvas de calibración de los homólogos C_{10}, C_{11}, C_{12} y C_{13} por separado, utilizando las áreas de los picos respectivos divididas por el área del pico del patrón interno (ácido benceno sulfónico). Para ello, se inyectaron seis disoluciones de estándares de LAS a concentraciones regularmente espaciadas, hasta 300 $\mu g\ ml^{-1}$. Las curvas de calibrado fueron lineales, con $r > 0.998$. En todos los casos, el contenido total de LAS se calculó como la suma de las áreas de los correspondientes homólogos e isómeros divididas por el área del pico del patrón interno. Finalmente, los límites de detección se calcularon para una relación señal/ruido = 3, que se midió a partir de 8 inyecciones de una disolución de 10 $\mu g\ ml^{-1}$ de LAS. Los parámetros significativos se indican en la Tabla XII.1.

Tabla XII.1. Repetitividad[a] de tiempos de migración (t_m) y áreas de pico (A), y límites de detección para una relación señal-ruido de 3.

Analito	t_m, %	A, %	LOD, $\mu g\ ml^{-1}$
C_{10}	1.7; 2.8	2.8; 4.3	2.4
C_{11}	1.2; 2.1	2.0; 2.8	4.1
C_{12}	1.4; 2.3	2.3; 3.0	3.5
C_{13}	1.6; 2.6	2.6; 4.0	2.9
LAS total	---	---	2.4

[a] Como desviaciones estándar relativas: intra-día; inter-día.

XII.3.5. Aplicación a muestras reales

La identificación y cuantificación de LAS en productos de limpieza domésticos e industriales, y la caracterización de los homólogos, estableciendo su distribución, se llevó a cabo utilizando el BGE constituido por ácido acético 10 mM, y dipentilamina 20 mM en etanol. Los resultados se muestran en la Tabla XII.2. Los distintos productos examinados mostraron diferencias importantes entre las distribuciones de sus homólogos. En la Figura XII.7 se muestra un electroferograma representativo de un detergente en polvo.

XII.4. Conclusiones

Se ha demostrado la posibilidad de separar LAS con excelente resolución entre homólogos y una resolución parcial de isómeros, utilizando concentraciones bajas de ácido acético y una alquilamina hidrofóbica (dipentilamina) en presencia de un ligero exceso de ésta en medio etanol. Bajo polaridad negativa, los LAS migran en contra del EOF, y al mismo tiempo son frenados por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas con los iones alquilamonio, aunque la posibilidad de asociación hidrofóbica con moléculas libres de alquilamina puede también tener lugar. La separación tiene lugar debido a las interacciones diferenciales entre los homólogos e isómeros del LAS con los componentes del sistema tampón de alquilamina. Un aumento en la resolución a nivel de isómeros tiene lugar cuando se incrementa la concentración del tampón, no obstante, a expensas de un aumento en el tiempo de análisis. Con el procedimiento propuesto se obtuvieron reproducibilidades en las áreas de los picos mejores que el 4.3%, y límites de detección de LAS total del orden de los 2.5 $\mu g\ ml^{-1}$.

Tabla XII.2. Análisis de muestras comerciales.

Muestras	LAS total declarado, %	LAS total encontrado, %	Distribución de homólogos, C_{10} / C_{11} / C_{12} / C_{13}, %
LAS comercial (Marlon A-360)	58.4	58.7 ± 0.3	10.4 / 41.6 / 38.0 / 10.0
Detergente líquido para lavadoras automáticas	3.90	3.76 ±0.13	9.5 / 36.6 / 34.4 / 19.5
Detergente líquido para prendas delicadas	7.01	6.94 ±0.12	10.3 / 36.9 / 33.4 / 19.4
Detergente líquido para ropa blanca	18.36	18.28 ± 0.24	8.9 / 38.4 / 32.6 / 20.1
Detergente líquido para ropa color	18.78	18.83 ± 0.17	9.9 / 35.7 / 33.4 / 21.0
Limpiasuelos amoniacal	4.11	4.14 ±0.10	10.1 / 36.8 / 33.8 / 19.3
Detergente líquido para vajillas	-	7.03 ± 0.08	9.3 / 38.9 / 34.4 / 17.4
Detergente en polvo para lavadoras automáticas	-	8.81 ± 0.23	13.7 / 39.8 / 31.8 / 14.7

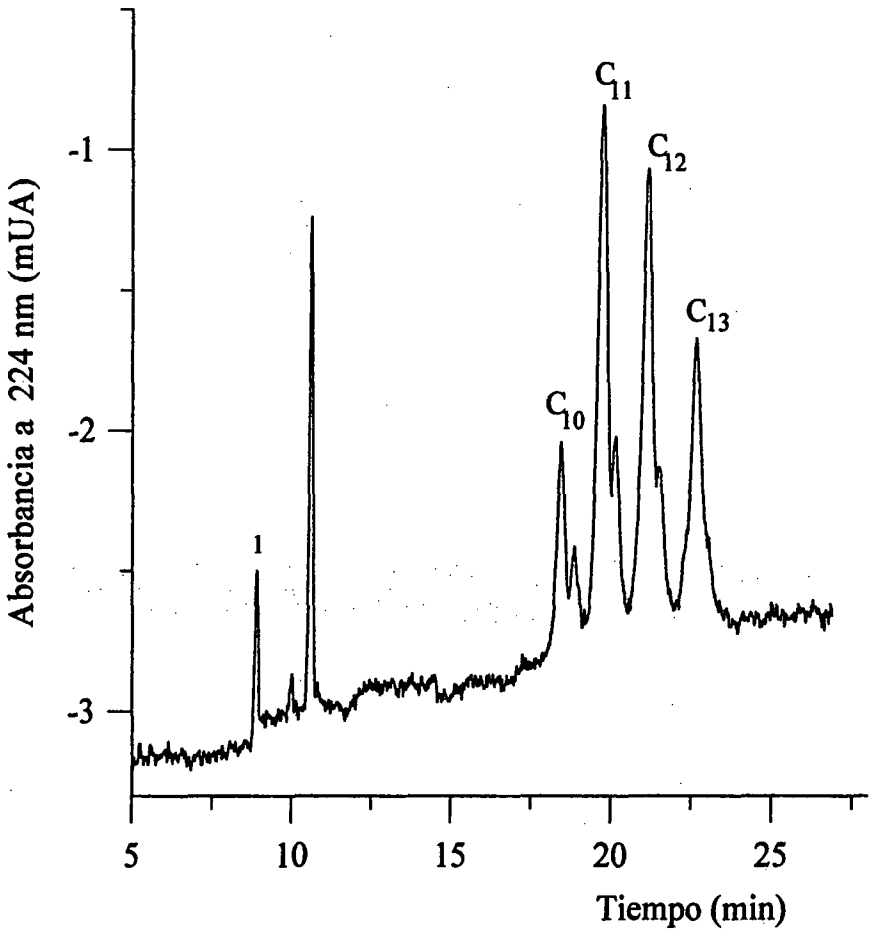


Figura XII.7. Electroferograma de un detergente en polvo obtenido en un medio etanol conteniendo ácido acético 10 mM y dipentilamina 20 mM en etanol. 1, Pico del estándar interno (ácido benceno sulfónico). Otras condiciones de trabajo como en la Figura XII.1.

XII.5. Referencias

1. Analysis of Surfactants, ed. T.M. Schmitt, Marcel Dekker, Nueva York, 1994.
2. A. Marcomini y W. Giger, Anal. Chem., 59 (1987) 1709.
3. J. Waters y C.G. Taylor, The colorimetric estimation of anionic surfactants, en Anionic Surfactants Chemical Analysis, ed. J. Ross, Marcel Dekker, Nueva York, 1977.
4. J. McEvoy y W. Geiger, Environ. Sci. Technol., 20 (1986) 376.
5. T. Reemtsma, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 473.
6. H. Hon-Nami y T. Hanya, J. Chromatogr., 161 (1978) 205.
7. H. Hellmann, Tenside Surf. Det., 28 (1991) 111.
8. E.M. Thurmann, T. Willoughby, L.B. Barber y K.A. Thorn, Anal. Chem., 59 (1987) 1798.
9. N. Buschmann y R. Schulz, Tenside Surf. Det., 30 (1993) 18.
10. J.R. Bondenmiller y H.W. Latz, Anal. Chem., 44 (1972) 926.
11. Y. Yokoyama, M. Kondo y H. Sato, J. Chromatogr. A, 643 (1993) 169.
12. L. Comellas, J.L. Portillo y M.T. Vaquero, J. Chromatogr. A, 657 (1993) 25.
13. A. Nakae, K. Tsuji y M. Yamanaka, Anal. Chem., 52 (1980) 2275.
14. A. Di Corcia, M. Marchetti, R. Samperi y A. Marcomini, Anal. Chem., 63 (1991) 1179.
15. J. Zweigenbaum, Chromatogram, 11 (1990) 9.
16. P.L. Desbene, C. Rony, B. Desmazieres y J.C. Jacquier, J. Chromatogr. A, 608 (1992) 375.
17. P.L. Desbene y C.M. Rony, J. Chromatogr. A, 689 (1995) 327.
18. K.D. Altria, I. Gill, J.S. Howells, C.N. Luscombe y R.Z. Williams, Chromatographia, 40 (1995) 527.
19. S. Chen y D.J. Pietrzyk, Anal. Chem., 65 (1993) 2770.
20. C. Vogt, K. Heinig, B. Langer, J. Mattusch y G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem., 352 (1995) 508.

21. G.M. McLaughlin, A. Weston y K.D. Hauffe, J. Chromatogr. A, 744 (1996) 123.
22. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, Analyst, 123 (1998) 349.
23. K. Heinig, C. Vogt y G. Werner, J. Chromatogr. A, 745 (1996) 281.
24. C. Kanz, M. Nolke, T. Fleischmann, H.P.E. Kohler y W. Giger, Anal. Chem., 70 (1998) 913.
25. Y. Walbroehl y J.W. Jorgenson, J. Chromatogr., 315 (1984) 135.
26. R.S. Sahota y M.G. Khaledi, Anal. Chem., 66 (1994) 1141.
27. H. Salimi-Moosavi y R.M. Cassidy, Anal. Chem., 67 (1995) 1067.
28. H. Salimi-Moosavi y R.M. Cassidy, Anal. Chem., 68 (1996) 293.
29. S. Fujiwara y S. Honda, Anal. Chem., 59 (1987) 487.
30. C. Schwer y E. Kenndler, Anal Chem., 63 (1991) 1801.

XIII. CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO XIII

CONCLUSIONES GENERALES

Los procedimientos desarrollados en esta Memoria para el control de calidad en diversos problemas ambientales e industriales, muestran la gran versatilidad y capacidad de la técnica empleada, la electroforesis capilar. A continuación, se resumirán las conclusiones fruto de los diversos resultados experimentales obtenidos en los capítulos IV, V, VII, VIII, X, XI y XII.

Parte A

1. Se ha descrito un procedimiento rápido y muy reproducible para la determinación de ácido L-ascórbico (AA) y ácido ascórbico total (AAT) en plantas vasculares y en líquenes, briófitos y hepáticas. Para ello, se utiliza CZE en capilares de sílice sin recubrimiento. La determinación de AAT se realiza después de su reducción con DL-homocisteína a pH 7.

2. Se han establecido los parámetros de calidad del procedimiento, entre ellos, el límite de detección, 0.2 $\mu g\ ml^{-1}$, que corresponde a 0.4 mg de AA / 100 g de muestra.

3. El método propuesto se ha validado por comparación con el método enzimático habitual. El procedimiento de CZE se puede aplicar correctamente y ofrece resultados para todas las muestras ensayadas, mientras que el método enzimático no se puede utilizar para cuantificar AA en algunas plantas que dan una alta absorción de fondo en la región UV.

4. Se ha desarrollado un procedimiento rápido y fiable de CZE capaz de separar y determinar AA, glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en plantas vasculares, en una inyección única. En otra alícuota del mismo extracto, y previa reducción con DL-homocisteína, se determina ácido dehidroascórbico (DHA).

5. Se han establecido los parámetros de calidad del procedimiento, entre ellos, los límites de detección de AA, GSH y GSSG, que se hallan en el intervalo 0.2 - 0.8 $\mu g\ ml^{-1}$, lo que corresponde a 0.04 - 0.16 mg de analito por 100 g de peso fresco de hojas de diversas plantas vasculares.

6. Se ha mostrado que plantas expuestas a altas concentraciones de ozono (1600 $\mu g\ m^{-3}$), en un sistema de fumigación de laboratorio, experimentan una reducción simultánea de los cocientes AA/(AA+DHA) y GSH/(GSH+GSSG).

7. También se ha mostrado que plantas cultivadas en el campo, en cámaras abiertas por arriba, sometidas durante unos 50 días a concentraciones de ozono mucho más bajas (concentraciones medias, 10 y 80 $\mu g\ m^{-3}$), experimentan una reducción más rápida del cociente AA/(AA+DHA) que del cociente GSH/(GSH+GSSG).

Parte B

8. Se ha demostrado que un electroferograma de CZE, obtenido con la fracción proteica soluble en etanol-agua, y utilizando capilares de sílice no recubiertos, contiene la suficiente información como para poder clasificar muestras de queso de acuerdo con su origen genético y tiempo de maduración. Se han podido reconocer hasta 18 picos como variables útiles para realizar estudios de análisis exploratorio de datos, análisis clasificatorio y construir modelos de regresión.

9. Sobre la base de estos electroferogramas, y utilizando regresión multivariante por el método de mínimos cuadrados parciales (PLS), se pueden predecir los contenidos de leche de vaca en quesos de cabra y oveja presumiblemente puros, así como en mezclas binarias o ternarias, con una desviación estándar próxima al 6-7%. Este resultado incluye quesos de bajo y alto grado de maduración.

10. Utilizando el mismo procedimiento se pueden construir modelos capaces de estimar también el tiempo de maduración en quesos elaborados con leche de cabra y oveja.

11. Se ha desarrollado un procedimiento de electroforesis capilar rápido y simple para la separación y cuantificación de los picos de las α-lactoalbúminas (α-LAs) y ß-lactoglobulinas (ß-LGs) de vaca, cabra y oveja en quesos binarios y ternarios, con discriminación incluso de las variantes genéticas A y B bovina y ovina de las correspondientes β-LGs.

12. Se han descrito dos procedimientos para la determinación de leche de vaca en quesos de cabra, oveja y mixtos, basados en la cuantificación de las α-LAs y de las ß-LGs, respectivamente. Se ha demostrado la superioridad del procedimiento basado en las α-LAs, que da resultados más exactos que el basado en las ß-LGs, y además tiene un límite de detección más bajo.

13. Los procedimientos, basados en el uso de tampones isoeléctricos a pH ácido, permiten utilizar elevados campos eléctricos sin causar por ello pérdida de eficacia por efecto Joule, además, la supresión efectiva de la ionización de los grupos silanol al pH de trabajo inhibe la adsorción de proteínas sobre la pared, y reduce el flujo electroosmótico, mejorando notablemente la reproducibilidad entre inyecciones.

14. Se ha propuesto un enfoque nuevo para realizar el calibrado en la determinación de la leche de vaca en quesos. Este enfoque, basado en la determinación previa de coeficientes de selectividad vaca/cabra o vaca/oveja, es más sencillo, las curvas de calibrado son lineales en vez de curvas, no tienden asintóticamente a infinito, y la precisión y exactitud son mejores que las indicadas en los demás procedimientos descritos en la bibliografía.

Parte C

15. Se ha mostrado que el uso de electrolitos de fondo (BGEs) conteniendo una sal biliar y elevadas concentraciones de un disolvente orgánico, permiten resolver mezclas de tensioactivos catiónicos con rapidez, y con una excelente resolución entre los homólogos. Además, se puede llevar a cabo su determinación con fiabilidad.

16. Para separar mezclas de cloruro de benzalconio (BKC) y cetilpiridinio (CPC) con una máxima resolución se recomienda un BGE que contenga tampón borato 80 mM de pH 8.5, 50 mM de SDC y 30% de etanol. En cambio, si lo que se desea es obtener una adecuada resolución con un tiempo de análisis corto, se recomienda sustituir el etanol por un 20% de THF.

17. Los tensioactivos y sus homólogos se pueden determinar con reproducibilidades por debajo del 2%, y con límites de detección de unos pocos $\mu g\ ml^{-1}$. El procedimiento propuesto se ha aplicado a la determinación de tensioactivos catiónicos en una amplia gama de productos industriales y domésticos.

18. Se ha descrito un procedimiento para separar y determinar alquilfenol etoxilados (APEs) con una excelente resolución entre los homólogos. Para ellos, se ha utilizado un tampón borato de pH 8.5 conteniendo una sal biliar.

19. A una concentración de sal biliar dada, se obtiene mejor resolución con sodio desoxicolato (SDC) que con sodio colato (SC). En presencia de pequeñas o moderadas concentraciones de disolvente orgánico la línea base mejora notablemente, mientras que la resolución puede mejorar o decrecer ligeramente.

20. Se propone un procedimiento para la determinación de APEs con una resolución óptima entre los homólogos. Este procedimiento proporciona también una huella dactilar del APE, que puede ser usada para determinar el número medio de unidades de EO y otros parámetros útiles en control de calidad, en la caracterización de productos desconocidos, en la monitorización de procesos de degradación, y en estudios de toxicidad y ambientales.

21. También se propone un procedimiento modificado que es más selectivo, y que resulta útil para determinar tensioactivos no iónicos, catiónicos y aniónicos en productos industriales y domésticos, con una única inyección de la muestra.

22. Además, con los dos BGEs recomendados, una región de los electroferogramas resulta adecuada para la identificación y evaluación de los APEs de bajo número de grupos de EO y los APs desetoxilados, lo que tiene interés en análisis ambiental.

23. Se ha demostrado la posibilidad de separar alquilbenceno sulfatos lineales (LAS) con excelente resolución entre homólogos y resolución parcial de isómeros, utilizando sales de alquilaminas, en medio etanol y en ligero exceso de amina.

24. Con el procedimiento propuesto se obtienen reproducibilidades inferiores al 4.3% y límites de detección de LAS total del orden de los 2.5 $\mu g\ ml^{-1}$. El procedimiento se ha aplicado a la determinación de LAS en productos de limpieza domésticos e industriales.

ANEXOS

ANEXO I

ANEXO I

ABREVIATURAS

α-CD	α-Ciclodextrina
α-CN	α-Caseína
α-LA	α-Lactoalbúmina
β-CD	β-Ciclodextrina
β-CN	β-Caseína
β-LG	β-Lactoglobulina
β-ME	β-Mercaptoetanol
γ-CN	γ-Caseína
κ-CN	κ-Caseína
AA	Ácido L-ascórbico
AAS	Espectrometría de absorción atómica
AAT	Ácido ascórbico total
ABS	Alquilbenceno sulfonato ramificado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Alcohol etoxilado
AEOS	Alquil sulfatos etoxilados
AOS	α-Olefin sulfonatos
APE	Alquilfenol etoxilado
APG	Alquilpoliglucósido
APX	Ascorbato peroxidasa
AS	Alquil sulfatos
ATP	Adenosín trifosfato
BGE	Electrolito soporte
BiAS	Sustancias activas al bismuto
BKC	Cloruro de benzalconio
BSA	Albúmina de suero bovino
BTA	Anhídrido bencenotricarboxílico
CAT	Catalasa
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
CF	Filtrado con carbono
CGE	Electroforesis capilar en gel
CHAPS	3-[3-(Cloroamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CIEF	Isoelectroenfoque capilar

CITP	Isotacoforesis capilar
CMC	Concentración micelar crítica
CODEA	Dietanolamida de coco
CPC	Cloruro de cetilpiridinio
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetil amonio
CZE	Electroforesis capilar zonal
DBAS	Sustancias activas al azul de disulfina
DBDA	Cloruro de dodecilbencildimetil amonio
DCIP	2,6-Diclorofenol-indofenol
DHA	Ácido dehidroascórbico
DHAR	Dehidroascorbato reductasa
DNBA	Ácido dinitrobenzoico
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-dinitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraácetico
EO	Óxido de etileno
EOF	Flujo electroosmótico o electroendosmótico
FAA	Alcanolamida
Fd	Ferredoxina
GC	Cromatografía de gases
GR	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión (reducido)
GSSG	Glutatión disulfuro
HDM	Bromuro de hexadimetrina
HEC	Hidroxietilcelulosa
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IDA	Ácido iminodiacético
IEF	Isoelectroenfoque
Ig	Inmunoglobulina
LAS	Alquilbenceno sulfonato lineal
LDA	Análisis discriminante lineal
LFS	Sistema de fumigación de laboratorio
LOD	Límite de detección
MBAS	Sustancias activas al azul de metileno
MDHA	Monodehidroascorbato
MDHAR	Monodehidroascorbato reductasa

MEKC	Cromatografía micelar capilar electrocinética
MES	Ácido 2-(N-morfolin)etano sulfónico
MHEC	Metilhidroxietilcelulosa
MPA	Ácido metafosfórico
MS	Espectrometría de masas
NACE	Electroforesis capilar en medio no acuoso
NADPH	Dihidronicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEM	N-Etilmaleimida
NF	Sin filtrar
NMR	Resonancia magnética nuclear
NMS	Naftaleno monosulfonato
NPE	Nonifenol polietoxilado
OBS	Octilbencenosulfonato
OPE	Octifenol polietoxilado
OTC	Cámaras abiertas por arriba
PA	Anhídrido ftálico
PAGE	Gel de poliacrilamida
PCA	Análisis de las componentes principales
pI	Punto isoeléctrico
PEG	Polietilenglicol
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
POD	Peroxidasa
PTS	p-Toluenosulfonato
PVA	Alcohol polivinílico
RuBISCO	Ribulosa 1,5-difosfatocarboxilasa-oxigenasa
SC	Colato sódico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDC	Desoxicolato sódico
SOD	Superóxido dismutasa
STTP	Tripolifosfato sódico
TAPS	Ácido N-[tris (hidroximetil)-metil]-3-aminopropanosulfónico
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía sobre capa fina
TMAOH	Hidróxido de tetrametilamonio
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
TZV	Violeta de tetrazolio

ANEXO II

ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 265, 275–281 (1998)
ARTICLE NO. AB982861

Determination of L-Ascorbic Acid and Total Ascorbic Acid in Vascular and Nonvascular Plants by Capillary Zone Electrophoresis

J. M. Herrero-Martínez,* E. Simó-Alfonso,* V. I. Deltoro,† A. Calatayud,† and G. Ramis-Ramos*,[1]
*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, and †Department of Vegetal Biology, Faculty of Biology, Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

Received June 9, 1998

A capillary zone electrophoresis (CZE) procedure for the determination of L-ascorbic acid (AA) and total ascorbic acid (TAA, as the sum of AA and dehydroascorbic acid) in vascular plants, lichens, bryophytes, and liverworts is described. The samples were frozen in liquid nitrogen and extracted with 2% metaphosphoric acid. To determine AA, an aliquot was directly injected in a fused-silica capillary. The determination of TAA was performed upon its reduction with DL-homocysteine at pH 7. The background electrolyte contained 60 mM sodium chloride, 60 mM sodium dihydrogen phosphate, 1 × 10^{-4}% hexadimetrine bromide, and NaOH up to pH 7. The procedure was rapid and highly reproducible; the limit of detection was 0.2 μg ml^{-1}, which corresponded to 0.4 mg/100 g of sample. The method was validated by comparison with an enzymatic assay. While the enzymatic assay failed to quantify AA in some plants owing to strong background UV absorption, CZE was successful in all the extracts assayed. © 1998 Academic Press

Key Words: **ascorbic acid; atmospheric pollution bioindicators; lichens; bryophytes; liverworts; capillary zone electrophoresis.**

L-Ascorbic acid (AA)[2] is universally distributed among animals and plants, where it is found in equilibrium with an oxidated form, L-dehydroascorbic acid (DHA). Both AA and total ascorbic acid (TAA, as the sum of AA and dehydroascorbic acid) are usually determined, since the AA/TAA ratio is an important indicator in environmental quality control (1). This ratio is perturbated by factors inducing plant stress, including mechanical damage and atmospheric pollution.

The AA and DHA concentrations in plants vary widely, with highest levels found in rapidly growing tissues and leaves (2). More than 3% of the fresh weight of some fruits is AA (3). Plant cells actively consume AA in several processes: (i) the removal of hydrogen peroxide and active free radical oxygen species produced by air pollutants (1, 4); (ii) the hydroxilation of proline residues in polypeptide chains (5); and (iii) the deepoxidation of carotenoids in the xanthophyll cycle (6). Additionally, AA has a role in the control of photosynthetic and mitochondrial electron transport (7) and in the control of plant cell division (8). High AA concentrations are found in chloroplasts, e.g., 50 mM in spinachs, presumably owing to the relevant function of AA in photosynthesis (9). Other cell parts contain also AA, i.e., cytosol, vacuoles, and the membrane (10, 11).

In humans, AA plays an important physiological role in the metabolism of iron, steroids, and aromatic aminoacids. Additionally, it has also been involved in the synthesis of polysaccharides and collagen and in neonatal development. An insufficient intake of AA produces collagen defficiency, which results in the symptoms of scurvy. The capacity of AA for inhibiting mutagenic cell growth has also been demonstrated *in vitro* (12–14).

The stability of aqueous AA solutions depend on pH, temperature, oxygen concentration, and metal ion traces which catalyze its oxidation (15–18). Spectrophotometry (19–28), differential pulse polarography (29), and adsorption potentiometry (30) have been used to determine both AA and TAA (this later upon reduction of DHA to AA) in fruit juices and other industrial

[1] To whom correspondence should be addressed. Fax: 34-963864436. E-mail: Guillermo.Ramis@uv.es.

[2] Abbreviations used: AA, L-ascorbic acid; DHA, L-dehydroascorbic acid; TAA, total ascorbic acid; CZE, capillary zone electrophoresis; BGE, background electrolyte; HDM, hexadimetrine bromide; MPA, metaphosphoric acid; TEMED, *N,N,N′,N′*-tetramethylethylenediamine; LOD, limit of detection.

0003-2697/98 $25.00
Copyright © 1998 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

products; however, these methods lack the adequate selectivity to analyze vascular and nonvascular plant extracts (19, 20). Specific procedures are based on the oxidation of AA in the presence of ascorbate oxidase (31–33) and on separation techniques, including gas chromatography with precolumn derivatization (34), reversed-phase (35–39), ion exclusion (40–44), ion-pair (45) and ion-exchange HPLC (46), isotachophoresis (47, 48), and capillary electroseparation (49–63).

Several capillary zone electrophoresis (CZE) procedures for the determination of AA in fruit juices and vegetables have been described (52–54, 56–59, 61). Capillaries coated with acrylamide (52, 54) and tetradecyltrimethylammonium bromide (61) have been used. Micellar electrokinetic chromatography with a background electrolyte (BGE) containing sodium dodecyl sulfate (49) or sodium deoxycholate (50, 51) has also been used to determine AA in vitaminic diet supplements and plants, respectively.

In this work, AA is determined by CZE in the presence of hexadimetrine bromide (HDM), a polimeric alkylammonium salt that efficiently inverts the electroosmotic flow at very low concentrations. The determination of DHA is performed as AA upon reduction with homocysteine. The procedure is rapid and highly reproducible, and the limits of detection are lower than those reported for other capillary electroseparation methods. The method is applied to vascular plants and to lichens, bryophytes, and liverworts, which usually have much lower AA and DHA concentrations than vascular plants, and is validated by comparison with an enzymatic method (31). The AA/TAA ratio in vascular and particularly in nonvascular plants is a valuable indicator in atmospheric pollution evaluation.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus

An HP^{3D} capillary electrophoresis system (Hewlett–Packard, Palo Alto, CA), provided with a diode array spectrophotometric detector, was used. The detection window was performed on the 33.5 cm × 50 μm i.d. untreated silica capillaries (Supelco, Bellafonte, USA) at 8.5 cm from the outlet rim. New capillaries were rinsed at 60°C as follows: 5 min with 1 M NaOH, 5 min with 0.1 M NaOH, and 10 min with water. At the beginning of each working session the capillary was rinsed for 30 min with the separation buffer at 23°C. Peak areas were divided by the respective migration times using the corresponding HP software option. A diode array spectrophotometer was used to perform enzymatic analysis (Model 8452A, Hewlett–Packard).

Reagents

A 250 μg ml^{-1} AA (Sigma, St. Louis, MO) stock solution was prepared in the presence of 2% (w/v) metaphosphoric acid (MPA; Aldrich, Milwaukee, WI). All solutions were stored at ca. 4°C; 10 μg ml^{-1} DHA (Aldrich) solutions in 2% MPA were prepared immediately before injection. Sodium and potassium hydroxides, sodium and potassium dihydrogen phosphates, boric acid, sodium chloride (Panreac, Barcelona, Spain), ascorbate oxidase (Prod. No. A0157, Sigma), DL-homocysteine (Sigma), and HDM containing from 25 to 50 hexadimethonium units (Fluka, Buchs, Switzerland) were used. In the experiments performed with acrylamide coated capillaries the following reagents were used: acrylamide, ammonium peroxydisulphate, N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine (TEMED), and 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate (Fluka). All solutions were prepared with deionized water (Barnstead deionizer; Sybron, Boston, MA). Before injection in the capillary, all solutions were degased in an ultrasonic bath and forced through 0.45-μm-pore-size nylon filters (Scharlau, Barcelona, Spain).

Plant Material

Parsley and spinachs were both cultivated in the laboratory and purchased at the local market and analyzed on the same day. The lichens *Parmelia acetabulum* (Necker) Duby, *Parmelia quercina* (Willd.) Vainio, and *Hypogymnia tubulosa* (Schaerer) Havaas; the bryophytes *Hypnum cupressiforme* (Hedw.) and *Tortula ruralis* (Hedw.) Gaertn., Meyer, and Scherb.; and the liverworts *Porella platyphylla* (L.) Pfeiff and *Frullania dilatata* (L.) Dum. were collected from their habitats in Sierra del Toro (Castellón, Spain, UTM 305XK8719) in the naturally dry state in February 1998. This plant material was immediately transported to the laboratory and used in the experiments within 1 week from collection.

Sample Preparation and DHA Reduction

Petiole and veins were removed from fresh parsley and spinach leaves. Both vascular and nonvascular plant samples were thoroughly cleaned, snap-frozen, and pulverized in liquid nitrogen. Subsequently, they were homogenized with ice-cold 2% MPA. The ratio of plant material to MPA was 2 g to 12 ml for parsley and spinachs and 0.5 g to 8 ml for lichen, bryophytes, and liverworts. To pellet all debris, the homogenate was centrifuged (6000 rpm, 4°C, 2 min), the supernatant was filtered (Mitex, 5 μm; Millipore), and an aliquot was injected.

To determine TAA, a 0.5-ml aliquot of the filtered extract was gently stirred with 30 mg homocysteine until complete solution and 30 μl of 2 M NaOH was

added (final pH was about 7). The mixture was immediately injected. The DHA concentration was calculated as the difference between TAA and AA.

CZE Procedure

Hydrodynamic injection at 50 mbar × 2 s was used. Separation was performed at −15 kV and 23°C in a buffer containing 60 mM sodium dihydrogen phosphate, 60 mM NaCl, 0.0001% HDM, and the necessary 0.1 M NaOH to reach pH 7. Detection wavelength was set at 265 nm. Between injections, pressure (1015 mbar) was used to rinse the capillary with the buffer for 10 min. Efficiencies were calculated as

$$N = 5.54 \left(\frac{t}{w_{1/2}}\right)^2, \quad [1]$$

where t is the migration time and $w_{1/2}$ is the peak width at half-height.

Enzymatic Procedure

The enzymatic determination of AA was performed by monitoring the absorbance decrease at 265 nm which was induced by oxidation to DHA by ascorbate oxidase as described by Luwe *et al.* (31). Reaction assays contained 1 ml of standard solution or plant extract and 2 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8); AA oxidation was started by adding 10 μl of a 0.25 units μl^{-1} ascorbate oxidase solution.

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary Studies

The stability of AA solutions in 2% MPA at 4°C was checked. Less than 1% absorbance decrease was observed for the AA absorption peak after 3 days. Thus, standard solutions and sample extracts were handled, stored, and injected in this medium. In strong and moderate acid media AA solutions contain the uncharged protonated form (log K = 4.17) (16), and in alkaline media the risk of oxidation increases rapidly (16). Thus, a BGE of pH 7 was selected as a compromise to maintain AA in an anionic form during separation and, at the same time, to reduce the risk of oxidation.

Injection at the cathode end and zero or reversed electroosmotic flow were selected to obtain low migration times for AA. For this purpose, several static and dynamic coatings were assayed. First, the capillary walls were coated with acrylamide (64). Using a 20 mM phosphate buffer of pH 7 and −15 kV, the AA peak appeared in less than 5 min. However, different capillaries gave rather different migration times, which was attributed to lack of reproducibility in the acrylamide coating properties. For this reason, dynamic coating with HDM was preferred. This polymer has been shown to be very effective in reducing and reversing the electroosmotic flow at very low concentrations (65).

The addition of a concentrated potassium monohydrogen phosphate solution to the extracts containing MPA has been recommended to increase the pH before reducing DHA with homocysteine (66–68). However, with this procedure, the AA peak was not observed. This was attributable to the anti-stacking effect produced by an excessive ionic strength. Therefore, 2 M NaOH and not K_2HPO_4 was used to increase the pH. Additionally, to avoid irreversible oxidation of DHA in neutral and alkaline media, homocysteine and not NaOH was added first. The final pH of the mixture, around 7, increased very little upon addition of more 2 M NaOH, indicating a large buffering capacity. This could be due to the presence of significant amounts of ortophosphate in the MPA. Upon injection on the recommended BGE, these solutions showed no loss of efficiency in the AA peak. Besides, consecutive injections showed no losses in sensitivity at least for 20 min after reduction; with 40 min losses were of ca. 30%.

To estimate the recovery of AA by reduction, a 10 μg ml^{-1} AA solution prepared in water was allowed to oxidize in the presence of 2% H_2O_2. Upon injection this solution showed a loss of AA of about 60% in 3 h. After addition of homocysteine and NaOH as indicated, followed by immediate injection, recovery was 97 ± 1% (n = 3). Experiments performed with solutions prepared with solid DHA, and also treated with homocysteine and NaOH, yielded recoveries of about 80%. The lower recovery obtained in this case was attributable to the low purity of solid DHA (60).

Optimization of Separation Conditions

Migration times and efficiencies obtained in the presence of 1 × 10^{-4}% HDM, at increasing phosphate and NaCl concentrations in the BGE, are shown in Table 1. When the phosphate concentration increased, migration time decreased and the efficiency was improved; however, 60 mM phosphate was used in the experiments that followed, since noise increased with higher concentrations. No significant improvements were observed by adding up to 80 mM boric acid to this buffer.

As shown in Table 1, the efficiency was largely improved by addition of NaCl to the buffer. The extracts prepared for the AA and TAA determinations contained large MPA and sodium metaphosphate concentrations, respectively; therefore, the improvement observed was probably due to an increase of the stacking effect produced by the higher BGE conductivity. It is interesting to note that an increase of the NaCl concentration had a larger effect on the efficiency than an

TABLE 1

Migration Time and Efficiency of the AA Peak with Different BGEs

Phosphate (mM)	NaCl (mM)	t (min)	$N \times 10^3$
20	0	13.3 ± 0.4	9
20	60	5.0 ± 0.3	57
20	100	3.8 ± 0.6	77
40	0	8.5 ± 0.2	17
60	0	4.9 ± 0.2	27
70	0	4.0 ± 0.2	32
60	20	4.07 ± 0.04	43
60	40	3.225 ± 0.008	59
60	60	2.88 ± 0.05	76

equivalent increase of the NaH_2PO_4 concentration. Further experiments were performed with a BGE of pH 7 containing 60 mM phosphate and 60 mM NaCl. An excessive current and loss of reproducibility were observed with higher NaCl concentrations. When the HDM concentration was increased from 1×10^{-4} to 5×10^{-3}%, the AA migration time decreased from 2.9 to 2.0 min, while the efficiency remained unaffected. With 1×10^{-4}% HDM no significant drift of the electroosmotic flow was observed for more than 60 runs.

Application to Real Samples, Figures of Merit, and Validation

A linear calibration curve with $r^2 = 0.9999$ was obtained by injecting six standard solutions with increasing AA concentrations up to 100 μg ml^{-1}. Sensitivity, limits of detection (LODs) in standard solutions and in plants, and repeatabilities and reproducibilities concerning both corrected area and migration time are shown in Table 2. The LOD was calculated as threefold the background noise divided by the sensitivity. The background noise, s, was obtained both by assuming that the width of the baseline at the peak region was $5s$ and as the standard deviation at the 10 μg ml^{-1} concentration level ($n = 10$). The same LODs were obtained by these two procedures.

TABLE 2

Analytical Figures of Merit for the CZE Method

Parameter	Value
Sensitivity	3.1×10^{-3} μg^{-1} ml mAU^{-1}
Repeatability of corrected area	0.9% ($n = 10$, 10 μg ml^{-1})
Repeatability of migration time	0.8% ($n = 10$, 10 μg ml^{-1})
Reproducibility of corrected area	1.2% ($n = 8$, 10 μg ml^{-1}, 8 days)
Reproducibility of migration time	1.1% ($n = 8$, 10 μg ml^{-1}, 8 days)
LOD with standard solutions	0.2 μg ml^{-1}
LOD in vascular plants	0.12 mg/100 g fresh wt
LOD in nonvascular plants	0.3 mg/100 g dry wt

TABLE 3

Concentrations of AA Found in Several Plants by the CZE and Enzymatic Methods[a]

Sample	CZE	Enzymatic
Parsley (cultivated)	258	—
Spinach (local market)	57.4	57.2
Spinach (cultivated)	81.7	80.7
Parmelia acetabulum	2.94	2.95
Parmelia quercina	1.82	1.84
Hypogymnia tubulosa	6.21	6.02
Hypnum cupressiforme	5.43	5.38
Tortula ruralis	10.5	—
Porella platyphylla	4.47	—
Frullania dilatata	1.79	1.85

[a] In mg AA per 100 g of fresh and dry sample in vascular and nonvascular plants, respectively.

The extracts of the vegetables indicated in Table 3 were analyzed both by the proposed CZE procedure and by the enzymatic method (31). As shown in Fig. 1, peaks of several unknown solutes were observed in the extracts. The AA peak was identified by comparing both migration time and absorption spectrum at the peak maximum with the corresponding data obtained by injecting a standard. In all the extracts, the AA peak appeared well separated from other peaks of the matrix, and the baseline noise at both sides of the AA peak was the same as with the standards. Thus, the LODs for the standards and the plant extracts were also the same. Furthermore, standard addition calibration curves were obtained by adding to the plant extracts three solutions with increasing AA concentrations up to 100 μg ml^{-1}. The curves were linear with $r^2 > 0.9998$, and in all cases the sensitivity was the same as with the external calibration method.

Three AA standard solutions containing increasing concentrations up to 50 μg ml^{-1} were used to obtain the calibration curves by the enzymatic procedure. The standard addition method was also used to obtain the AA concentrations in the extracts. The curves were linear with $r^2 > 0.998$. As shown in Table 3, the CZE and the enzymatic procedures yielded similar values for each sample. Application of the statistical test for paired data showed no significant differences at the 95% confidence level. When the extract was strongly colored, as occurred with parsley, *T. ruralis*, and *Porella platyphylla*, the initially large absorbance at 265 nm hindered the application of the enzymatic method.

The AA concentrations found for the vascular plants are similar to those reported in the literature. The higher AA concentration given by cultivated spinach

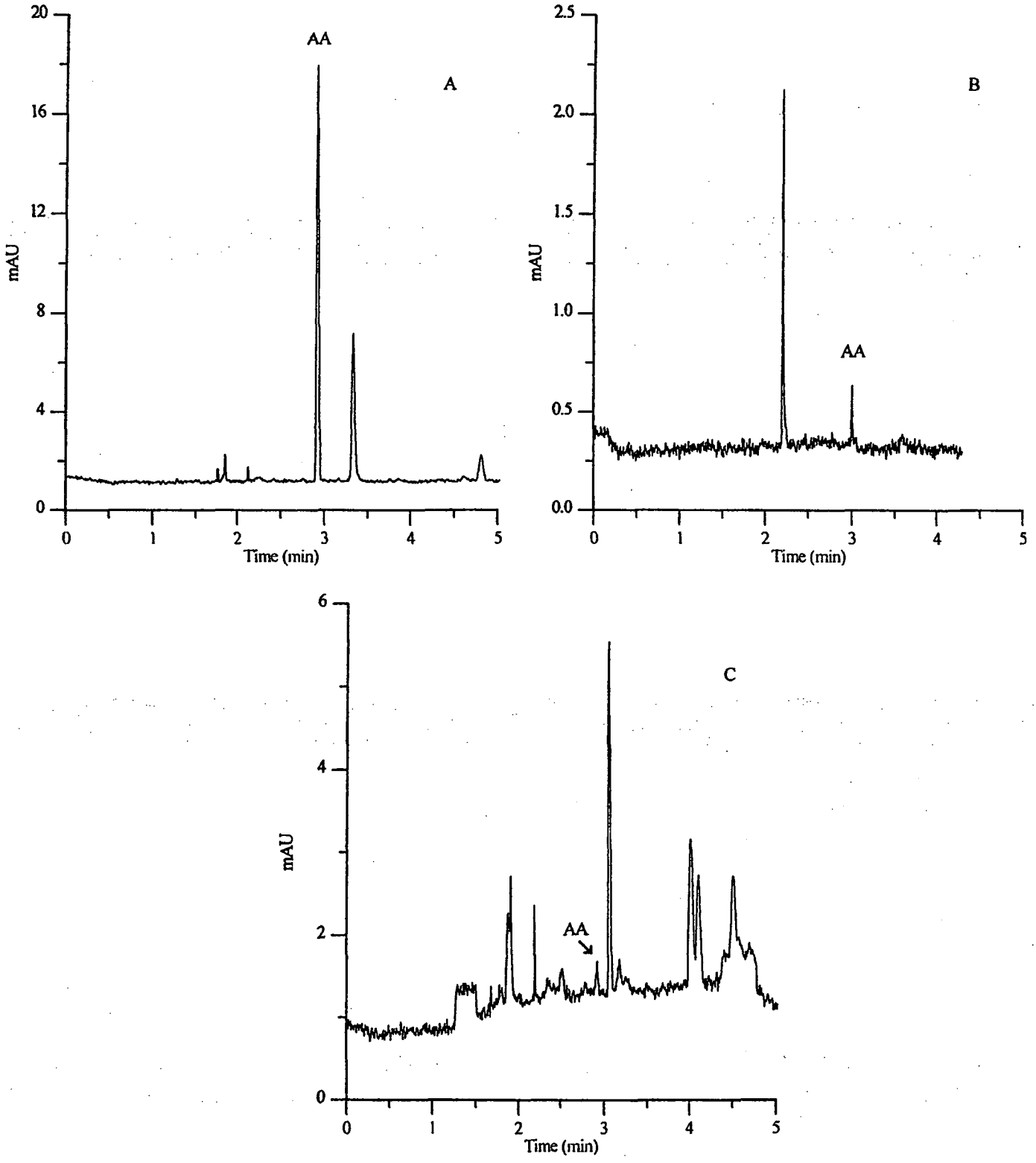


FIG. 1. Electropherograms of plant extracts (AA concentrations found in the extracts): (A) spinach (95.8 μg ml^{-1}); (B) lichen *Parmelia acetabulum* (1.8 μg ml^{-1}); and (C) bryophyte *Tortula ruralis* (6.5 μg ml^{-1}).

TABLE 4

Concentrations of AA and TAA Found in Several Plants by the CZE Method

Sample	AA[a]	TAA[a]	AA/TAA
Spinach	40.9	50.7	0.81
Parmelia quercina	2.49	4.33	0.58
Frullania dilatata	3.61	35.0	0.10

[a] In mg AA per 100 g of fresh and dry sample in vascular and nonvascular plants, respectively.

with respect to the sample from the local market should be attributed to the shorter time elapsed between sample field collection and analysis. Nonvascular plants showed much lower AA concentrations than vascular plants. This should be attributed to the smaller weight of the photobiont (algae) in relation to the larger weight of the fungi which is almost devoid of AA. The endosymbiontic algal cell population may account for only 10–15% of the thalline weight in species such as *P. sulcata* (69).

The results of determinations of AA, DHA, and AA/TAA ratios in spinachs, a lichen, and a liverwort are shown in Table 4. The value obtained for spinach was similar to reported data (31). The enzymatic procedure could not be applied in some cases because of the excessive absorbance of the extracts.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Projects GV-3205/95 and CA-2389 (Generalitat Valenciana, Spain). J. M. H-M. and V. I. D. are the beneficiaries of fellowships from the Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana.

REFERENCES

1. Heber, U., Miyake, C., Mano, J., Ohno, C., and Asada, K. (1996) *Plant Cell Physiol.* **37**, 1066–1072.
2. Mapson, L. W. (1970) *in* The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol. 1, Food Science and Technology, a Series of Monographs (Hulme, A. C., Ed.), pp. 369–384, Academic Press, London.
3. Jaffe, G. M. (1984) *In* Handbook of Vitamins (Machlin, J. L., Ed.), pp. 199–244, Dekker, New York.
4. Conklin, P. L., Williams, E. H., and Last, R. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9970–9974.
5. Arrigoni, O. (1994) *J. Bioenerg. Biomemb.* **26**, 407–419.
6. Neubauer, C., and Yamamoto, H. (1994) *Photosynth. Res.* **39**, 137–147.
7. Forti, G., and Eherenheim, A. M. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1183**, 408–412.
8. Navas, P., Villalba, J. M., and Cordoba, F. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1197**, 1–13.
9. Foyer, C. (1993) *In* Antioxidants in Higher Plants (Alscher, R. G., and Hess, J. L., Eds.), pp. 31–58, CRC Press, Boca Raton, FL.
10. Anderson, J. W., Foyer, C. H., and Walker, D. A. (1983) *Planta* **158**, 442–450.
11. Rautenkranz, A. A. F., Li, L., Machler, F., Martinola, E., and Oertli, J. J. (1994) *Plant Physiol.* **106**, 187–193.
12. Wittes, R. C. (1985) *N. Engl. J. Med.* **312**, 178–179.
13. Borenstein, B. (1987) *Food Technol.* **41**, 98–99.
14. Bendich, A. (1987) *Food Technol.* **41**, 112–114.
15. Mikova, K., and Davidele, J. (1974) *Chem. Listy* **68**, 715–720.
16. Sauberlich, H. E., Green, M. D., and Omaye, S. T. (1982) *in* Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses (Seib, P. A., and Tolbert, B. M., Eds.), pp. 199–221, American Chemical Society, Washington, DC.
17. Fleming, J. F., and Bensch, K. G. (1983) *Int. J. Pept. Protein Res.* **22**, 355–361.
18. Washko, P. W., Hartzell, W. O., and Levine, M. (1989) *Anal. Biochem.* **181**, 276–282.
19. Lowik, M. R. H., Schrijver, J., and Wedel, M. (1991) *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **61**, 43–45.
20. Kim, J. M., Huang, K., and Schmid, R. D. (1990) *Anal. Lett.* **23**, 2273–2282.
21. Sano, A., Kuwayama, T., and Furukawa, M. (1995) *Anal. Sci.* **11**, 405–409.
22. Jain, A., Chaurasia, A., and Verma, K. K. (1995) *Talanta* **42**, 779–787.
23. Huang, H. P., Cai, R. X., Du, Y. M., and Zeng, Y. E. (1995) *Anal. Chim. Acta* **309**, 271–275.
24. Ruiz, T. R., Lozano, C. M., and Sanz, A. (1995) *Anal. Chim. Acta* **308**, 299–307.
25. Arya, S. P., and Mahajan, M. (1995) *Anal. Sci.* **11**, 853–855.
26. Abdelmageed, O. H., Khashaba, P. Y., Askal, H. F., Saleh, G. A., and Refaat, I. H. (1995) *Talanta* **42**, 573–579.
27. Özgür, M. Ü., and Sungur, S. (1995) *Talanta* **42**, 1631–1640.
28. Hadady, K. K., and Fabian, I. (1995) *Anal. Lett.* **28**, 1421–1435.
29. Esteve, M. J., Farré, R., and Frígola, A. (1995) *Fresenius J. Anal. Chem.* **351**, 804–805.
30. Hu, X., and Leng, Z. (1995) *Anal. Lett.* **28**, 2263–2274.
31. Luwe, M. W. F., Takahama, U., and Heber, U. (1993) *Plant Physiol.* **101**, 969–976.
32. Stevanato, R., Avigliano, L., Finazzi-Agro, A., and Agro, A. (1985) *Anal. Biochem.* **149**, 537–542.
33. Liu, T. Z., Chin, N., Kiser, M. D., and Bigler, W. N. (1982) *Clin. Chem.* **28**, 2225–2228.
34. Rose, R. C., and Nahrwold, D. (1982) *Anal. Biochem.* **123**, 389–393.
35. Lloyd, L. L., Warner, F. P., Kennedy, J. F., and White, C. A. (1988) *J. Chromatogr.* **437**, 447–452.
36. Lloyd, L. L., Warner, F. P., Kennedy, J. F., and White, C. A. (1988) *Food Chem.* **28**, 257–268.
37. Gennaro, M. C., and Abrigo, C. (1991) *Fresenius J. Anal. Chem.* **340**, 422–425.
38. Zapata, S., and Dufour, J. R. (1992) *J. Food Sci.* **57**, 506–511.
39. Chen, X., and Sato, M. (1995) *Anal. Sci.* **11**, 749–754.
40. Kim, H. J., and Kim, Y. K. (1988) *J. Food Sci.* **53**, 1525–1527.
41. Wagner, H. P., and McGarrity, M. J. (1991) *J. Chromatogr.* **546**, 119–124.
42. Graham, W. D., and Annette, D. (1992) *J. Chromatogr.* **594**, 187–194.
43. Ito, T., Murata, H., Yasui, Y., Matsui, M., Sakai, T., and Yamauchi, K. (1995) *J. Chromatogr. B* **667**, 355–357.
44. Miura, Y., Maruyama, T., and Koh, T. (1995) *Anal. Sci.* **11**, 617–621.

45. Daood, H. G., Biacs, P. A., Dakar, M. A., and Hajdu, F. (1994) *J. Chromatogr. Sci.* **32**, 481–487.
46. Leubolt, R., and Klein, H. (1993) *J. Chromatogr.* **640**, 271–277.
47. Baldesten, A., Hjalmarsson, S. G., and Neumann, G. (1978) *Fresenius Z. Anal. Chem.* **290**, 148–149.
48. Tsuda, T., and Fukuba, H. (1988) *J. Micronutr. Anal.* **4**, 217–227.
49. Fujiwara, S., Iwase, S., and Honda, S. (1988) *J. Chromatogr.* **447**, 133–140.
50. Marshall, P. A., Trenerry, V. C., and Thompson, C. O. (1995) *J. Chromatogr. Sci.* **33**, 426–432.
51. Thompson, C. O., and Trenerry, V. C. (1995) *Food Chem.* **53**, 43–50.
52. Ling, B. L., Baeyens, W. R. G., Acker, P. V., and Dewaele, C. (1992) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 717–721.
53. Koh, E. V., Bissell, M. G., and Ito, R. K. (1993) *J. Chromatogr.* **633**, 245–250.
54. Chiari, M., Nesi, M., Carrea, G., and Righetti, P. G. (1993) *J. Chromatogr.* **645**, 197–200.
55. Jegle, U. (1993) *J. Chromatogr. A* **652**, 495–501.
56. Schiewe, J., Mrestani, Y., and Neubert, R. (1995) *J. Chromatogr. A* **717**, 255–259.
57. Davey, M. W., Bauw, G., and Van Montagu, M. (1996) *Anal. Biochem.* **239**, 8–19.
58. Fukushi, K., Takeda, S., Wakida, S. I., Yamane, M., Higashi, K., and Hiiro, K. (1997) *J. Chromatogr. A* **772**, 313–320.
59. Choi, O. K., and Jo, J. S. (1997) *J. Chromatogr. A* **781**, 435–443.
60. Davey, M. W., Bauw, G., and Van Montagu, M. (1997) *J. Chromatogr. B* **697**, 269–276.
61. Wu, C. H., Lo, Y. S., Lee, Y. H., and Lin, T. I. (1995) *J. Chromatogr. A* **716**, 291–301.
62. Prochazkova, A., Krivankova, L., and Bocek, P. (1998) *Electrophoresis* **19**, 300–304.
63. Honda, S., Naitoh-Ohta, Y., Togashi, K., and Taga, A. (1997) *Anal. Sci.* **13**, 557–564.
64. Hjerten, S. (1985) *J. Chromatogr.* **347**, 191–198.
65. Galceran, M. T., Puignou, L., and Diez, M. (1996) *J. Chromatogr.* **732**, 167–174.
66. Iwase, H., and Ono, I. (1993) *J. Chromatogr.* **654**, 215–220.
67. Behrens, W. A., and Madere, R. (1987) *Anal. Biochem.* **165**, 102–107.
68. Dennison, D. B., Brawley, T. G., and Hunter, G. L. K. (1981) *J. Agric. Food Chem.* **29**, 927–929.
69. Honegger, R. (1991) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 553–578.

ANEXO III

Simultaneous Determination of L-Ascorbic Acid, Glutathione, and Their Oxidized Forms in Ozone-Exposed Vascular Plants by Capillary Zone Electrophoresis

JOSE M. HERRERO-MARTÍNEZ, ERNESTO F. SIMÓ-ALFONSO, AND GUILLERMO RAMIS-RAMOS*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

VICENTE I. DELTORO, ANGELES CALATAYUD, AND EVA BARRENO

Department of Plant Biology, Faculty of Biology, Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

Simultaneous determination of ascorbic acid (AA), glutathione (GSH), and oxidized glutathione (GSSG) in vascular plants has been achieved by capillary zone electrophoresis. A background electrolyte containing a phosphate buffer of pH 7 and hexadimethrin bromide for dynamic control of electroosmotic flow was used. Separation was performed in less than 5 min. The signal was simultaneously monitored at 265 and 200 nm. Dehydroascorbic acid (DHA) was determined in another aliquot of the same plant extract upon reduction with DL-homocysteine. Limits of detection of AA, GSH, and GSSG ranged from 0.2 to 0.8 μg mL^{-1}, which corresponded from 0.04 to 0.16 mg per 100 g fresh weight of tomato, watermelon, and potato leaves. Plants exposed to a high ozone concentration (1600 μg m^{-3}) in a laboratory fumigation system during 1, 2, 3, and 5 h showed progressive ozone-induced oxidative stress. This could be seen as a simultaneous decrease of the AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) ratios; however, the decline rate was higher for AA/(AA+DHA) than for GSH/(GSH+GSSG) in plants cultivated in the field, in open-top chambers, during ca. 50 days with much lower ozone concentrations (mean concentrations, 10 and 80 μg m^{-3}).

Introduction

The oxygenic environment of aerobic life inevitably leads to the production of a number of reactive oxygen species such as superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and organic peroxides and radicals as byproducts of cellular metabolism. The presence of these reactive oxygen species leads to the condition of oxidative stress. Primary among the systems that exist to prevent or limit oxidative damage are nonenzymatic antioxidants, such as L-ascorbic acid (AA, vitamin C), glutathione (GSH, γ-L-glutamyl-L-cysteinylglycine), and α-tocopherol (vitamine E).

Both AA and GSH are universally distributed in the vast majority of prokaryotic and eukaryotic cells, where they undergo interconversions with their oxidized forms, L-dehydroascorbic acid (DHA) and glutathione disulfide (GSSG), respectively. These redox systems are involved in a wide variety of cellular reactions (*1–4*). The AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) ratios are important indicators in environmental quality control (*5*). These ratios are disturbed by factors inducing plant stress such as mechanical damage and/or atmospheric pollution.

The AA and DHA concentrations vary widely in plants, with the highest levels being found in rapidly growing tissues and leaves (*6*). More than 3% of the fresh weight of some fruits is AA (*7*). Plant cells actively consume AA in several processes: (i) the removal of hydrogen peroxide and active free radical oxygen species produced by air pollutants (*5, 8*); (ii) the hydroxylation of proline residues in polypeptide chains (*9*); (iii) the de-epoxidation of carotenoids in the xanthophyll cycle (*10*). Additionally, AA has a role in the control of photosynthetic and mitochondrial electron transport (*11*) and in the control of plant cell division (*12*). High AA concentrations are found in chloroplasts, e.g., 50 mM in spinach, presumably owing to the relevant function of AA in photosynthesis (*4*). Other organelles also contain AA, i.e., cytosol, vacuoles, and the cell membrane (*13, 14*).

Numerous physiological functions have been attributed to GSH in plants (*15*), such as the storage of sulfur in its reduced form and the regulation of the expression of some genes (*16*). Additionally, GSH is involved in the redox regulation of the cell cycle (*17*) and in the defense of plants and other organisms against oxidative stress (*18*) owing to its redox-active thiol group. The GSH concentration in the chloroplast stroma is thought to be close to 5 mM, which is large enough for GSH to act as an important redox buffer, preventing enzyme inactivation by protecting protein thiol groups from oxidation (*19–21*). A specific function of GSH in the maintenance of the ascorbate pool in plant cells has been demonstrated (*21*).

Spectrophotometry (*22–31*), differential pulse polarography (*32*), and adsorption potentiometry (*33*) have been used to determine both AA and DHA (upon reduction to AA) in fruit juices and other industrial products. However, these methods lack the adequate selectivity to analyze vascular and nonvascular plant extracts (*22, 23*). Specific procedures are based on the oxidation of AA in the presence of ascorbate oxidase (*34–36*) and on separation techniques including gas chromatography with precolumn derivatization (*37*), reversed-phase (*38–42*), ion exclusion (*43–47*), ion pair (*48*) and ion exchange HPLC (*49*), isotachophoresis (*50, 51*), and capillary electroseparation (*52–66*).

Several capillary zone electrophoresis (CZE) procedures for the determination of AA in fruit juices and vegetables have been described (*55–57, 59–62, 64*). Capillaries coated with acrylamide (*55, 57*) and tetradecyl trimethylammonium bromide (*64*) have been used. Other methods for the determination of AA in vitaminic diet supplements and plants are based on micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) with a background electrolyte (BGE) containing sodium dodecyl sulfate (*52*) and sodium deoxycholate (*53, 54*), respectively.

Most HPLC and CZE methods for the determination of GSH involve derivatization (*67–70*), e.g., addition of *N*-ethylmaleimide to block the thiol group (*71*), followed by spectrophotometric or fluorometric detection. Nevertheless, these procedures are incompatible with ascorbate analysis owing to the variations of the AA/(AA+DHA) ratio induced by pH adjustment to neutral and alkaline values. Underiva-

* Corresponding author phone: 34-963983003; fax: 34-963864436; e-mail: Guillermo.Ramis@uv.es.

10.1021/es991068l CCC: $19.00 © 2000 American Chemical Society
Published on Web 02/24/2000

tized GSH and GSSG have been simultaneously determined using HPLC and CZE with electrochemical detection (*72–74*).

Simultaneous determination of AA and GSH has been achieved both by HPLC with electrochemical detection (*75*) and CZE (*63*). The procedure of Sofic et al. (*75*) entails three injections: first, an aliquot is directly injected to determine AA and GSH; second, another aliquot is previously incubated with glutathione reductase and NADPH to determine (GSH+GSSG); and finally, (AA+DHA) is quantified in a third aliquot, which is previously treated with dithiothreitol to reduce DHA. The procedure was applied to animal and plant tissues. Using CZE with uncoated silica capillaries and a BGE containing a 200 mM borate buffer of pH 9 and 20% (v/v) acetonitrile, Davey et al. (*63*) were able to determine AA, GSH, and GSSG of a single injection in plant extracts. Although a DHA peak was also observed, quantitation of this analyte was not achieved.

We have previously described (*76*) a CZE procedure for the determination of AA and (AA+DHA) (upon reduction of DHA with DL-homocysteine) in vascular plants, lichens, bryophytes, and liverworts. In the present work, a CZE procedure for the determination of AA, DHA, GSH, and GSSG is described. An aliquot was directly injected to determine AA, GSH, and GSSG, and the signal was simultaneously monitored at two wavelengths; another aliquot was previously treated with DL-homocysteine and injected to quantify (AA+DHA). Vascular plants exposed to oxidative stress were analyzed, and the results were compared to those obtained using control plants.

Experimental Section

Apparatus. An HP^{3D} capillary electrophoresis system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), equipped with a diode array spectrophotometric detector, was used. The detection window was performed on the 33.5 cm × 50 μm i.d. untreated silica capillaries (Supelco, Bellefonte, PA) at 8.5 cm from the outlet rim. New capillaries were rinsed at 60 °C as follows: 5 min with 1 M NaOH, 5 min with 0.1 M NaOH, and 10 min with water. Prior to each working session, the capillary was rinsed for 30 min with the separation buffer at 23 °C. Peak areas were divided by the respective migration times using the corresponding HP software option.

Reagents. Stock solutions containing 250 μg mL^{-1} of AA, GSH, and GSSG (Sigma, St. Louis, MO) were prepared in ice-cooled 2% (w/v) metaphosphoric acid (MPA, Aldrich, Milwaukee, WI). All solutions were stored at ca. −20 °C in darkness. Sodium hydroxide, sodium dihydrogen phosphate, sodium chloride (Panreac, Barcelona, Spain), DL-homocysteine (Sigma), and hexadimethrin bromide (HDM, a polymer containing from 25 to 50 hexadimethonium units) (Fluka, Buchs, Switzerland) were used. All solutions were prepared with deionized water (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA). Prior to injection in the capillary, all solutions were degassed in an ultrasonic bath for 1 min and forced through 0.45 μm pore size nylon filters (MSI, Westboro, MA).

Plant Material and Field Experiments. Spinach (*Spinacea oleracea*), watermelon (*Citrullus lanatus*), potato (*Solanum tuberosum*), and tomato (*Lycopersicum esculentum*) were used as follows:

(i) Spinach, from the local market, was analyzed on the same day.

(ii) Three week-old watermelon seedlings were transplanted to large pots containing a commercial soil mixture and transferred to an open-top chamber (OTC) supplied with charcoal filtered (CF) air. They were grown under two different light regimes: full sunlight and 50% sunlight. After 3 more weeks the plants were collected and the leaves analyzed.

(iii) Potato was grown in pots within OTCs, from the begining of January to mid March. In the OTCs plants were exposed either to CF air or to nonfiltered (NF) ambient air. During the experiment, ozone concentration was continuously monitored at the experimental site using an EPA-approved monitor (Model 1008, Dasibi, Glendale, CA). Mean ozone levels during potato growth were 10 and 80 μg m^{-3} in the OTCs supplied with CF and NF air, respectively. The latter value slightly exceeds the Ambient Air Quality Standard set at 65 μg m^{-3} by the European Community.

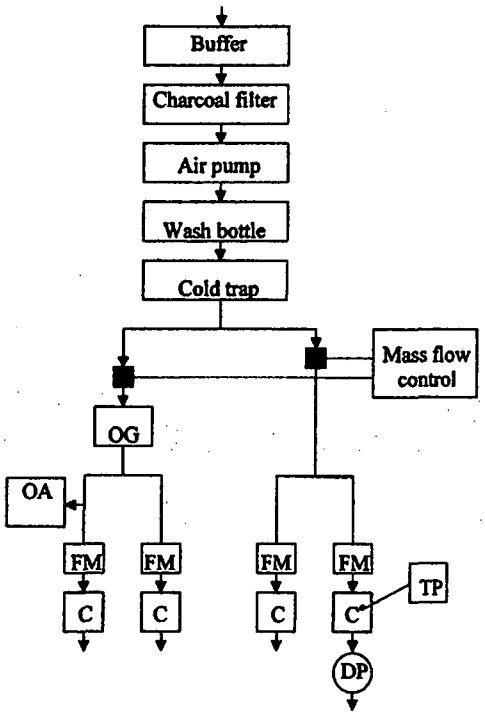


FIGURE 1. Diagram of the laboratory fumigation system (LFS). Symbols: OG, ozone generator; OA, ozone analyzer; FM, flowmeter; C, cuvette; TP, temperature probe; DP, dew point measuring system.

(iv) Tomato was germinated in a greenhouse supplied with CF air and exposed, at the seedling stage (20 days), to 1600 μg m^{-3} ozone using the laboratory fumigation system (LFS) described below.

Laboratory Fumigation Experiments. A diagram of the LFS is shown in Figure 1. It was constructed with four stainless steel PTFE-coated cuvettes of 2.5 L internal volume covered with transparent glass lids and was implemented with precise monitoring of air flow rate through the cuvettes, with continuous control of environmental parameters and simultaneous recording of pollutant concentration. To reduce potential problems with absorption and desorption of ozone on the system walls, all connections in contact with gases were PTFE-coated or made of stainless steel. To buffer variations in CO_2 concentration, ambient air was previously circulated through a large container. Subsequently, the air was moistened by bubbling through a wash bottle filled with distilled water at room temperature. An activated charcoal filter was placed immediately downstream from the air pump to remove background levels of pollutants. Humidity was regulated to a dew point of 20.0 ± 0.1 °C using a cold trap (Model KF 18/2, Walz, Germany), which resulted in a relative humidity (RH) of 97 ± 1% in the cuvettes.

After preconditioning, the air stream was split into two separate lines, control and ozonated, each one with two cuvettes connected in parallel. In the control line, one of the cuvettes was also used for RH and temperature monitoring. The humidity was monitored by a dew point mirror measuring system (Model TS-2, Walz) and the temperature by means of a probe inserted in the cuvette. In the ozonated line, the air flow was passed through a laboratory ozonator (UV-

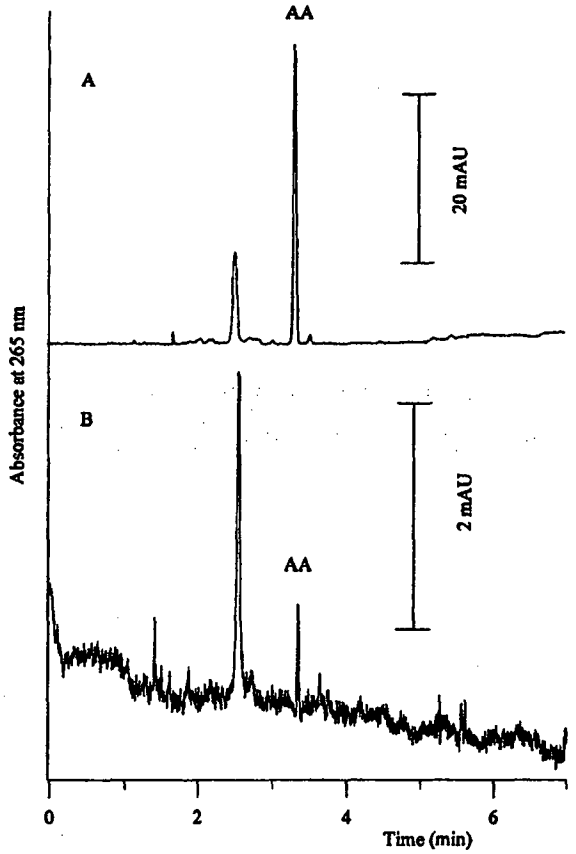


FIGURE 2. Electropherograms of tomato extracts monitored at 265 nm: A, control sample; B, after 3 h exposure to 1600 μg m^{-3} ozone in the LFS.

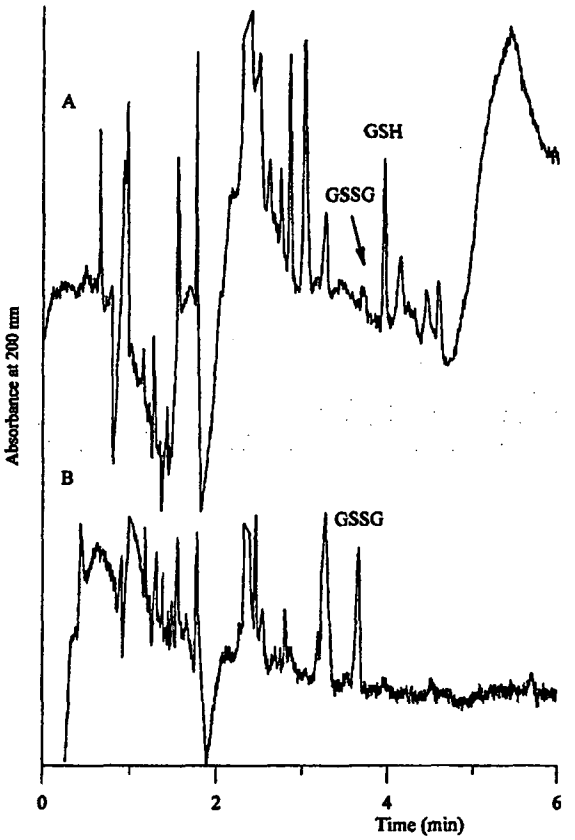


FIGURE 3. Electropherograms of tomato extracts monitored at 200 nm: A, control sample; B, after 3 h exposure to 1600 μg m^{-3} ozone in the LFS.

source, SIR, Spain). The ozone concentration was monitored before entering the cuvettes with an O_3 analyzer (Model 1008-RS, Dasibi). The flow rate was maintained at 2 L min^{-1} at each cuvette with calibrated mass flow controllers (5850 TR-series, Brooks Instruments, Holland) and adjustable flowmeters. The four cuvettes were submerged in a thermostatized bath at 20.0 ± 0.1 °C.

Plants were either introduced in the control cuvettes or in the fumigation cuvettes. Randomized experiments in which the plants were exposed 1, 2, 3, and 5 h to 1600 μg m^{-3} ozone were performed.

Sample Preparation for CZE. In all cases, the petiole and veins were removed from the leaves, which were immediately frozen in liquid nitrogen. Subsequently, they were homogenized with ice-cooled 2% MPA in a mortar. The ratio of plant material to MPA solution was 2 g of spinach per 12 mL and 2 g of tomato, potato, and watermelon per 4 mL. To pellet all debris, the homogenate was centrifuged (6000 rpm, 4 °C, 2 min), the supernatant was filtered (Mitex 5 μm, Millipore), and an aliquot was injected.

To determine (AA+DHA), a 1.0 mL aliquot of the filtered extract was gently stirred with 100 mg of DL-homocysteine until complete solution, and 50 μL of 2 M NaOH was added (final pH was about 7). The mixture was immediately injected. The DHA concentration was calculated by subtracting the AA concentration previously found in the same sample.

CZE Procedure. The BGE composition and conditions used to determine AA, GSH, and GSSG in a single run were the same as those used elsewhere to quantitate AA (*76*). Injection at the cathode end and reversed electroosmotic flow were selected to obtain low solute migration times. Hydrodynamic injection at 50 mbar × 2 s was used. Separation was performed at −15 kV and 23 °C in a BGE containing 60 mM sodium dihydrogen phosphate, 60 mM NaCl, 0.0001% HDM, and the appropriate amount of 0.1 M NaOH to reach pH 7. The electroosmotic flow was reversed with HDM, which provided a cationic dynamic coating of the capillary at very low polymer concentrations (*77*). The detection wavelengths were 265 nm for AA and 200 nm for GSH and GSSG. Between injections, pressure (1015 mbar) was used to rinse the capillary with the BGE for 10 min.

Results and Discussion

Preliminary and Stability Studies. The AA, GSH, and GSSG peaks appeared at 3.2, 4.0, and 3.7 min, respectively. No significant drift of the electroosmotic flow was observed for more than 60 runs. Recovery of oxidized AA by reduction with DL-homocysteine was 97 ± 1% (n = 3) (*76*). Both AA, GSH, and GSSG standard solutions in 2% MPA, and spinach and tomato extracts prepared in the same medium, were used in the stability studies. The stability of the peak areas was checked three to six times at regular intervals, in standard solutions and extracts kept at 23 °C, in an ice bath at 0 °C and frozen at −20 °C during 45 min, 24 h, and 20 days, respectively. In all cases, no significant variations were observed between CZE peak areas obtained at different time values. For the experiments that followed, standard solutions and sample extracts were used immediately or stored less than a few hours at 0 °C and less than 1 week at −20 °C when necessary.

Figures of Merit in Standard Solutions and Plant Analysis. Electropherograms of control and ozone-exposed tomato extracts monitored at two detection wavelengths are shown in Figures 2 and 3. The AA, GSH, and GSSG peaks in the extracts were identified by comparing both the migration times and the absorption spectra at the peak maximum with the corresponding data obtained by injecting standard solutions. The plant extracts were also injected before and after addition of a small amount of the corresponding

TABLE 1. Figures of Merit for AA, GSH, and GSSG

parameter	AA	GSH	GSSG
sensitivity (slope of the calibration curve)			
external calibration with standards ($n = 7$)	3.1×10^{-3}	9.8×10^{-4}	1.6×10^{-3}
standard addition calibration with plant extracts[a] ($n = 4$)	2.92×10^{-3}	9.54×10^{-4}	1.53×10^{-3}
repeatability of corrected area (rel SD, $n = 10$)			
with standards (10 μg mL^{-1}), %	0.9	1.4	1.5
with plant extracts,[a] %	1.2	1.8	2.1
repeatability of migration time (rel SD, $n = 10$)			
with standards (10 μg mL^{-1}), %	0.8	1.7	1.5
with plant extracts,[a] %	1.1	2.2	2.3
reproducibility of corrected area (rel SD, $n = 8$, 8 days)[b]			
with standards, %	1.2	1.9	1.8
with plant extracts,[a] %	1.5	2.7	2.8
reproducibility of migration time (rel SD, $n = 8$, 8 days)[b]			
with standards, %	1.1	2.5	2.3
with plant extracts,[a] %	1.4	3.2	3.4
LOD,[c] μg mL^{-1}	0.2	0.8	0.6

[a] Mean obtained with tomato and spinach extracts at the natural concentration levels of the analytes. [b] Calculated along 8 consecutive days with the same standard solution or with the same plant extract; in each case, aliquots of the solution were introduced in eight vials which were frozen at −20 °C; each day, an aliquot was analyzed by the same analyst and using the same instrument. [c] Given as concentration in the extract; conversion factor for tomato, watermelon, and potato samples: 1 μg mL^{-1} = 0.2 mg/100 g fresh weight.

TABLE 2. Concentrations of AA, DHA, GSH, and GSSG (mg/100 g Fresh Weight), and AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) Ratios in Different Plant Species Subjected to Different Treatments

species	type of expt and treatment	AA	DHA	AA/(AA+DHA)	GSH	GSSG	GSH/(GSH+GSSG)
spinach	none (samples from market)	75.4	18.5	0.80	1.42	0.75	0.65
watermelon	OTC, sun-grown under CF air	15.2	2.08	0.88	1.02	0.27	0.79
	OTC, shade-grown under CF air	12.3	7.23	0.59	1.26	0.75	0.60
tomato	LFS, control ($n = 10$)	22.7	6.04	0.79	1.52	0.65	0.70
	LFS, 0 h exposure to ozone ($n = 2$)	22.5	5.25	0.81	1.48	0.57	0.72
	LFS, 1 h exposure to ozone ($n = 2$)	8.34	19.4	0.30	0.76	1.30	0.37
	LFS, 2 h exposure to ozone ($n = 2$)	5.02	22.8	0.18	0.29	1.77	0.14
	LFS, 3 h exposure to ozone ($n = 2$)	0.33	27.5	0.012	ND[a]	1.87	
	LFS, 5 h exposure to ozone ($n = 2$)	0.14	27.6	0.0052	ND[a]	1.99	
potato	OTC, sun-grown under CF air ($n = 4$)	1.944	16.04	0.1081	1.17	0.32	0.785
	OTC, sun-grown under NF air ($n = 4$)	0.284	17.47	0.016	ND[a]	1.67	

[a] ND = not detected.

standard; in all cases, the area of the analyte peak increased. Additionally, the AA and GSH peaks decreased and the GSSG peak increased when the plants were treated with ozone, which confirmed the assignment of the peaks to the analytes. In all cases, the peaks of the three analytes appeared well separated from the other matrix peaks.

Linear calibration curves with $r^2 > 0.998$ were obtained by injecting a blank and seven standard solutions with 10, 20, 40, 60, 80, 100, and 200 μg mL^{-1} for AA and 10, 20, 40, 60, 80, 100, and 150 μg mL^{-1} for GSH and GSSG. The sensitivity, the repeatability (during one working session), and reproducibility (during 8 days) concerning both corrected peak areas and migration times and the limit of detection (LOD) are shown in Table 1. For each analyte, the LOD was calculated by multiplying by 3 the standard deviation of the peak area, s, divided by the slope of the calibration curve (*78*). The values of s for AA, GSH, and GSSG were obtained by injecting 10 aliquots of 10 μg mL^{-1} solutions of each analyte. Both standard solutions and plant extracts yielded the same LODs.

Standard addition calibration curves were also obtained by adding three solutions with increasing AA, GSH, and GSSG concentrations up to 100 μg mL^{-1} to plant extracts. In all cases, linear regression straight-lines ($r^2 > 0.998$), with statistically zero intercepts, and the same slope as with the external calibration method (slopes are given in Table 1) were obtained.

Biological Perspective. The concentrations of AA, DHA, GSH, and GSSG found in control and fumigated samples are presented in Table 2. From a biological perspective, the fact that sun-grown plants exhibited larger AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) ratios than shade-grown plants is consistent with a need for a greater capacity for protection against light as previously shown by Logan et al. (*79*). On the other hand, the changes in the antioxidant pools of fumigated tomato and potato plants are in agreement with the proposed role of these substances in the removal of ozone or its free radical byproducts.

The AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) ratios obtained for control and ozone fumigated tomato plants are plotted in Figure 4. The results showed that both stress indicators decreased progressively with increasing fumigation time, while control samples exhibited constant values. These results agreed well with data provided in Table 2, which showed that DHA and GSSG levels increased at the expense of their reduced forms. To compare the decline rates of both stress bioindicators, the normalized AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) ratios (normalization was performed by dividing the ratios by their respective maxima at zero exposure time) were plotted versus exposure time (figure not shown). No significant differences between the decline rates of both redox systems were observed. This suggested that the plants underwent severe oxidative stress in accordance to the high ozone concentrations used, indicating that accumulation of the pollutant presumably exceeded the rate of regeneration of both AA and GSH. It has been demonstrated that GSH increases in response to air pollution in the lichen *Xanthoria parietina* (*80*), and the same trend has been observed with

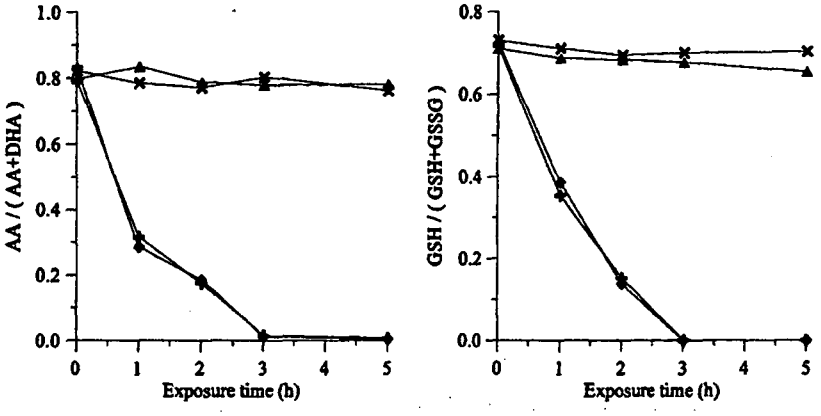


FIGURE 4. Influence of the ozone exposure time on the AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG) ratios in tomato leaves. Results obtained with the control (×, ▲) and fumigation (+, ♦) cuvettes of the LFS.

other plants exposed to ozone (*34, 81*). The different results described here could be explained by the very high ozone concentration used in our LFS experiments.

On the other hand, the results obtained with potato plants in the OTC experiments, which combined longer exposure times at lower ozone concentrations, showed a differential response of the two redox systems. The AA/(AA+DHA) ratio in potato plants exposed to CF air (mean ozone concentration, 10 $\mu g\ m^{-3}$) was much lower than the corresponding GSH/(GSH+GSSG) ratio. This result agrees well with the results of Luwe et al. (*34*). Potato plants exposed to NF air showed much lower values of both bioindicators; unfortunately, the differential response of the redox systems could not be evaluated in these samples, since the GSH peak was below the quantitation limit.

Simultaneous evaluation of both redox bioindicators, AA/(AA+DHA) and GSH/(GSH+GSSG), in the same plant extract, can be considered useful for two reasons: first, to confirm the results in the evaluation of the oxidative stress of a given sample, and second, because the proposed procedure constitutes a reliable tool to investigate the differential response of the two redox systems to the action of the oxidative stress agents. The variance associated with a change of procedure, or to a different injection, is eliminated by using a single electrophoretic run; therefore, the procedure described here appears more suitable for the study of the differential response between the two redox systems than procedures based on separate determinations. The main drawback of the procedure, the relatively high quantitation limit for GSH, can be overcome by using capillaries with an extended light path.

Acknowledgments

Work supported by Projects GV-3205/95 and CA-2389 (*Generalitat Valenciana*, Spain); J.M.H-M. and V.I.D. are the beneficiaries of fellowships from the Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana.

Literature Cited

(1) Meister, A.; Anderson, M. E. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 711–760.
(2) Penninckx, M. J.; Elskens, M. T. *Adv. Microb. Physiol.* **1993**, *34*, 239–301.
(3) Padh, H. *Nutr. Rev.* **1991**, *46*, 65–78.
(4) Foyer, C. In *Antioxidants in Higher Plants;* Alscher, R. G., Hess, J. L., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1993; pp 31–58.
(5) Heber, U.; Miyake, C.; Mano, J.; Ohno, C.; Asada, K. *Plant Cell Physiol.* **1996**, *37*, 1066–1072.
(6) Mapson, L. W. In *The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol. 1 (Food Science and Technology, a Series of Monographs)*; Hulme, A. C., Ed.; Academic Press: London, 1970; pp 369–384.
(7) Jaffe, G. M. In *Handbook of Vitamins;* Machlin, J. L., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1984; pp 199–244.
(8) Conklin, P. L.; Williams, E. H.; Last, R. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 9970–9974.
(9) Arrigoni, O. *J. Bioenerg. Biomemb.* **1994**, *26*, 407–419.
(10) Neubauer, C.; Yamamoto, H. *Photosynth. Res.* **1994**, *39*, 137–147.
(11) Forti, G.; Eherenheim, A. M. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1183*, 408–412.
(12) Navas, P.; Villalba, J. M.; Cordoba, F. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1197*, 1–13.
(13) Anderson, J. W.; Foyer, C. H.; Walker, D. A. *Planta* **1983**, *158*, 442–450.
(14) Rautenkranz, A. A. F.; Li, L.; Machler, F.; Martinoia, E.; Oertli, J. J. *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 187–193.
(15) Rennenberg, H. In *Amino acids and their derivatives in higher plants;* Wallsgrove, R. M., Ed.; Cambridge University Press: U.K., 1995; pp 155–171.
(16) Baier, M.; Dietz, K. J. *Plant J.* **1997**, *12*, 179–190.
(17) Russo, T.; Zambrano, N.; Esposito, F.; Ammendola, R.; Cimino, F.; Fiscella, M.; Jackman, J.; O'Connor, M.; Anderson, C. W.; Apella, E. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29386–29391.
(18) Grant, C. M.; MacIver, F. H.; Dawes, I. W. *Curr. Genet.* **1996**, *29*, 511–515.
(19) Foyer, C. H.; Halliwell, B. *Planta* **1976**, *133*, 21–25.
(20) Halliwell, B.; Foyer, C. H. *Planta* **1978**, *139*, 9–17.
(21) Alscher, R. G. *Physiol. Plant.* **1989**, *77*, 457–464.
(22) Lowik, M. R. H.; Schrijver, J.; Wedel, M. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* **1991**, *61*, 43–45.
(23) Kim, J. M.; Huang, K.; Schmid, R. D. *Anal. Lett.* **1990**, *23*, 2273–2282.
(24) Sano, A.; Kuwayama, T.; Furukawa, M. *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 405–409.
(25) Jain, A.; Chaurasia, A.; Verma, K. K. *Talanta* **1995**, *42*, 779–787.
(26) Huang, H. P.; Cai, R. X.; Du, Y. M.; Zeng, Y. E. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 271–275.
(27) Ruiz, T. R.; Lozano, C. M.; Sanz, A. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *308*, 299–307.
(28) Arya, S. P.; Mahajan, M. *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 853–855.
(29) Abdelmageed, O. H.; Khashaba, P. Y.; Askal, H. F.; Saleh, G. A.; Refaat, I. H. *Talanta* **1995**, *42*, 573–579.
(30) Özgür, M. Ü.; Sungur, S. *Talanta* **1995**, *42*, 1631–1640.
(31) Hadady, K. K.; Fabian, I. *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 1421–1435.
(32) Esteve, M. J.; Farré, R.; Frígola, A. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *351*, 804–805.
(33) Hu, X.; Leng, Z. *Anal. Lett.* **1995**, *28*, 2263–2274.
(34) Luwe, M. W. F.; Takahama, U.; Heber, U. *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 969–976.
(35) Stevanato, R.; Avigliano, L.; Finazzi-Agro, A.; Agro, A. *Anal. Biochem.* **1985**, *149*, 537–542.
(36) Liu, T. Z.; Chin, N.; Kiser, M. D.; Bigler, W. N. *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 2225–2228.
(37) Rose, R. C.; Nahrwold, D. *Anal. Biochem.* **1982**, *123*, 389–393.
(38) Lloyd, L. L.; Warner, F. P.; Kennedy, J. F.; White, C. A. *J. Chromatogr.* **1988**, *437*, 447–452.
(39) Lloyd, L. L.; Warner, F. P.; Kennedy, J. F.; White, C. A. *Food Chem.* **1988**, *28*, 257–268.
(40) Gennaro, M. C.; Abrigo, C. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, *340*, 422–425.
(41) Zapata, S.; Dufour, J. R. *J. Food Sci.* **1992**, *57*, 506–511.
(42) Chen, X.; Sato, M. *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 749–754.
(43) Kim, H. J.; Kim, Y. K. *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 1525–1527.

(44) Wagner, H. P.; McGarrity, M. J. *J. Chromatogr.* **1991**, *546*, 119–124.
(45) Graham, W. D.; Annette, D. *J. Chromatogr.* **1992**, *594*, 187–194.
(46) Ito, T.; Murata, H.; Yasui, Y.; Matsui, M.; Sakai, T.; Yamauchi, K. *J. Chromatogr. B* **1995**, *667*, 355–357.
(47) Miura, Y.; Maruyama, T.; Koh, T. *Anal. Sci.* **1995**, *11*, 617–621.
(48) Daood, H. G.; Biacs, P. A.; Dakar, M. A.; Hajdu, F. *J. Chromatogr. Sci.* **1994**, *32*, 481–487.
(49) Leubolt, R.; Klein, H. *J. Chromatogr. A* **1993**, *640*, 271–277.
(50) Baldesten, A.; Hjalmarsson, S. G.; Neumann, G. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1978**, *290*, 148–149.
(51) Tsuda, T.; Fukuba, H. *J. Micronutr. Anal.* **1988**, *4*, 217–227.
(52) Fujiwara, S.; Iwase, S.; Honda, S. *J. Chromatogr.* **1988**, *447*, 133–140.
(53) Marshall, P. A.; Trenerry, V. C.; Thompson, C. O. *J. Chromatogr. Sci.* **1995**, *33*, 426–432.
(54) Thompson, C. O.; Trenerry, V. C. *Food Chem.* **1995**, *53*, 43–50.
(55) Ling, B. L.; Baeyens, W. R. G.; Acker, P. V.; Dewaele, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, *10*, 717–721.
(56) Koh, E. V.; Bissell, M. G.; Ito, R. K. *J. Chromatogr. A* **1993**, *633*, 245–250.
(57) Chiari, M.; Nesi, M.; Carrea, G.; Righetti, P. G. *J. Chromatogr. A* **1993**, *645*, 197–200.
(58) Jegle, U. *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 495–501.
(59) Schiewe, J.; Mrestani, Y.; Neubert, R. *J. Chromatogr. A* **1995**, *717*, 255–259.
(60) Davey, M. W.; Bauw, G.; Van Montagu, M. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 8–19.
(61) Fukushi, K.; Takeda, S.; Wakida, S. I.; Yamane, M.; Higashi, K.; Hiiro, K. *J. Chromatogr. A* **1997**, *772*, 313–320.
(62) Choi, O. K.; Jo, J. S. *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 435–443.
(63) Davey, M. W.; Bauw, G.; Van Montagu, M. *J. Chromatogr. B* **1997**, *697*, 269–276.
(64) Wu, C. H.; Lo, Y. S.; Lee, Y. H.; Lin, T. I. *J. Chromatogr. A* **1995**, *716*, 291–301.
(65) Prochazkova, A.; Krivankova, L.; Bocek, P. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 300–304.
(66) Honda, S.; Naitoh-Ohta, Y.; Togashi, K.; Taga, A. *Anal. Sci.* **1997**, *13*, 557–564.
(67) Wong, K. S.; Yeung, E. S. *Mikrochim. Acta* **1995**, *120*, 321–327.
(68) Hogan, B. L.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2841–2845.
(69) Cavrini, V.; Gotti, R.; Andrisano, V.; Gatti, R. *Chromatographia* **1996**, *42*, 515–520.
(70) Orwar, O.; Fishman, H. A.; Ziv, N. E.; Scheller, R. H.; Zare, R. N. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4261–4268.
(71) Piccoli, G.; Fiorani, M.; Biagiarelli, B.; Palma, F.; Potenza, L.; Amicucci, A.; Stocchi, V. *J. Chromatogr. A* **1994**, *676*, 239–246.
(72) Zhou, J., O'Shea, T. J.; Lunte, S. M. *J. Chromatogr. A* **1994**, *680*, 271–277.
(73) Lunte. S. M.; O'Shea, T. J. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 79–86.
(74) O'Shea, T. J.; Lunte, S. M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 247–250.
(75) Sofic, E.; Riederer, P.; Burger, R.; Gsell, W.; Heuschneider, G. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, *339*, 258–260.
(76) Herrero-Martínez, J. M.; Simó-Alfonso, E.; Deltoro, V. I.; Calatayud, A.; Ramis-Ramos, G. *Anal. Biochem.* **1998**, *265*, 275–281.
(77) Galceran, M. T.; Puignou, L.; Diez, M. *J. Chromatogr. A* **1996**, *732*, 167–174.
(78) Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. In *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*; Elsevier: Amsterdam, 1997; pp 431–432.
(79) Logan, B. A.; Barker, D. H.; Demmig-Adams, B.; Adams, W. W., III *Plant, Cell Environ.* **1996**, *19*, 1083–1090.
(80) Silberstein, L.; Siegel, B. Z.; Siegel, S. M.; Mukhtar, A.; Galun, M. *Lichenologist* **1996**, *28*, 367–383.
(81) Ranieri, A.; D'Urso, G.; Nali, C.; Lorenzini, G.; Soldatini, G. F. *Physiol. Plant.* **1996**, *97*, 381–387.

Received for review September 20, 1999. Revised manuscript received December 21, 1999. Accepted December 21, 1999.

ES991068L

ANEXO IV

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN LECHE DE VACA Y DEL TIEMPO DE CURADO EN QUESOS NO BOVINOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DE LA FRACCIÓN PROTEICA SOLUBLE EN ETANOL-AGUA

Traducción del Capítulo VII, correspondiente al artículo publicado en: Electrophoresis, 21 (2000) 633-640, José Manuel Herrero-Martínez, Ernesto F. Simó-Alfonso, Guillermo Ramis-Ramos, Cecilia Gelfi y Pier Giorgio Righetti.

Resumen

Se describe un nuevo método para evaluar la adulteración de quesos de cabra y de oveja con leche de vaca mediante electroforesis capilar zonal (CZE). Las muestras de queso se extrajeron con una mezcla etanol-agua 20:80 v/v en presencia de urea 3 M y de un 1% de ß-mercaptoetanol durante una hora. Después de centrifugar y extraer los lípidos, el precipitado se disolvió en un tampón isoeléctrico constituido por ácido iminodiacético, IDA, 50 mM a pH = pI = 2.3, urea 6 M e hidroxietilcelulosa al 0.5%, y se analizó mediante CZE aplicando un campo eléctrico de 700 V/cm. Se resolvieron un total de 18 picos característicos para el conjunto de los tres tipos de quesos estudiados, definiéndose un total de 18 variables, cada una correspondiente al área de un pico. Se observó una excelente similitud entre los perfiles electroforéticos obtenidos para quesos de un determinado origen animal, mientras que los perfiles de los quesos elaborados con diferentes tipos de leche diferían considerablemente entre ellos. La mayoría de los picos fueron comunes a los tres tipos de leche, pero el perfil difirió dependiendo del tipo de leche empleada. Para el estudio estadístico de los datos se emplearon el análisis de las componentes principales, el análisis discriminante lineal y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). En particular, mediante el uso de la regresión por PLS, se predijo el contenido en leche de vaca en quesos de cabra y oveja presumiblemente puros, así

como en mezclas binarias y ternarias de los mismos, siendo las desviaciones estándar del 6-7%. También se predijo el tiempo de curado en quesos de cabra y oveja.

Palabras clave: tampones isoeléctricos; electroforesis capilar zonal; queso; proteínas.

1. Introducción

La determinación del origen animal de la leche es una tarea importante en control de calidad de quesos y otros productos lácteos. En particular, la adulteración fraudulenta de quesos de cabra y oveja con leche de vaca es relativamente habitual, lo cual es debido a: (i) fluctuaciones estacionales en la disponibilidad de leche de cabra y oveja; (ii) el mayor precio de la leche de cabra, y en especial de oveja, en comparación con la leche de vaca; y (iii) la oportunidad de utilizar la superproducción ocasional de leche de vaca sin perder beneficios. Otra importante característica del queso, también evaluada en control de calidad, es el tiempo de maduración o curado. Aunque la interpretación química del proceso de maduración es complicada e incompleta, este parámetro es importante en relación con el sabor y olor del queso.

Se puede extraer tanto información cualitativa como cuantitativa del origen animal del queso a partir del análisis de proteínas. Para ello, se puede orientar el trabajo en dos direcciones: (i) aislar las proteínas características de la especie animal en estudio, para ser evaluadas y usadas en una calibración univariante; (ii) obtener un patrón o perfil que abarque picos de numerosas proteínas, y cuantificar varias características de dicho perfil para ser usadas como variables en una técnica de calibración multivariante [1]. El enfoque (i) es el que se utiliza habitualmente para la determinación de la composición del queso, mientras que la evaluación del tiempo de curado se realiza con frecuencia mediante el enfoque (ii).

Ramos y Juárez [2] han evaluado la aplicabilidad de métodos electroforéticos, de inmunoensayo y cromatográficos a la determinación de leche de vaca usando el enfoque (i). Pellegrino y col. [3] usaron la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa para la determinación de leche de vaca en mozzarella de búfalo, así como

en quesos de cabra [4] y oveja [5]. Molina y col. [6] predijeron los porcentajes de leche de vaca, cabra y oveja en quesos españoles mediante el análisis de las proteínas séricas, separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Smeyers-Verbeke y col. [7] desarrollaron un procedimiento multivariante para la identificación de leche de vaca, cabra y oveja mediante el análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases, seguido de análisis discriminante lineal (LDA).

Por otra parte, la madurez del queso se ha evaluado mediante varias técnicas, entre las que destaca la electroforesis en placa de gel [8, 9] y la cromatografía líquida [10-14]. Pham y Nakai [12] clasificaron quesos cheddar de acuerdo con el tiempo de curado en base a los datos obtenidos mediante cromatografía líquida de extractos acuosos, seguida de un LDA en varios pasos. Se han empleado una serie de parámetros proteolíticos para caracterizar quesos manchegos [15], así como para predecir el tiempo de maduración mediante regresión por PLS y otras técnicas de regresión multivariante [16].

La electroforesis capilar (CE) es una técnica, rápida, altamente automatizada, eficaz y cuantitativa para el análisis de biopolímeros, muy adecuada para llevar a cabo tareas de control de calidad en industrias lácteas y agencias reguladoras. Recientemente, numerosos estudios han demostrado que la CE es una técnica adecuada para cuantificar proteínas lácteas [17] usando capilares no recubiertos [18-28] y recubiertos [29-39]. Cattaneo y col. [35] demostraron la capacidad de la CZE para determinar hasta un 8% de leche de vaca en mezclas de leche de diverso origen. Cartoni y col. [38, 39], empleando capilares metilsilanizados, cuantificaron hasta un 2 % de leche de vaca en quesos de oveja y de búfalo. Respecto a la evaluación del tiempo de maduración en quesos, Strickland y col. [26] emplearon la CE para monitorizar y caracterizar los cambios químicos producidos en el queso cheddar durante su maduración.

Por otra parte, Righetti y col. [40-46] han desarrollado técnicas rápidas de CZE usando tampones isoeléctricos, los cuales, debido a sus conductividades reducidas, son compatibles con altos gradientes de voltaje, lo que se traduce en altas resoluciones con bajos tiempos de migración. Estos autores han aplicado los tampones

isoeléctricos ácidos en la separación de péptidos [41,42], oligonucleótidos [43, 44] y proteínas presentes en harina [45] y maíz [46].

En este Capítulo se desarrolla un procedimiento para la rápida identificación y cuantificación de adulteraciones por adición de leche de vaca en quesos elaborados con leche de cabra y/o oveja, en base a los perfiles proteicos obtenidos mediante CZE de extractos preparados con una mezcla agua-etanol (20:80, v/v). Las separaciones empleando ácido iminodiacético como tampón isoeléctrico se llevan a cabo en pocos minutos. El estudio de los resultados mediante diversas técnicas multivariantes de análisis exploratorio de datos, así como de regresión y predicción, muestra que los electroferogramas contienen información relacionada con el origen animal de las muestras y con el tiempo de curado. Por ello, las técnicas de regresión multivariante permitieron evaluar satisfactoriamente el contenido en leche de vaca y el tiempo de curado en quesos de cabra y de oveja.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

El ácido iminodiacético (IDA), la urea y el ß-mercaptoetanol (ß-ME) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA), y la hidroxietilcelulosa (HEC, masa molecular media 27 KDa) de Polysciences (Warrington, PA, USA). Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (Barnstead, Sybron, Boston, MA, USA).

2.2. Aparatos

Los capilares de sílice fundida (27 cm de longitud total, 20 cm de longitud efectiva, 50 µm de diámetro interno) se obtuvieron de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Los experimentos de CZE se realizaron con un equipo electroforético P/ACE 2100 de Beckman (Fullerton, CA, USA) provisto de un

detector espectrofotométrico de filtros de banda, controlado por un ordenador IBM PS/2 provisto del software "System Gold".

2.3. Origen y preparación de las muestras

Las muestras de queso de composición garantizada fueron suministradas por Mercadona S.A. y por Lácteas Toledo S.A. (Tabla 1). Las porciones de queso, con un peso aproximado de 0.2 g, se extraen durante 1 hora con una mezcla etanol:agua (20:80, v/v), en presencia de urea 3 M y un 1% de ß-ME, a temperatura ambiente y bajo agitación vigorosa. Los extractos se centrifugan durante 10 min a 7000 *g*. Se adiciona un exceso de acetona con el fin de eliminar los lípidos y precipitar las proteínas. Después de centrifugar durante 20 min a 7000 *g*, el precipitado se disuelve en un tampón que contiene IDA 50 mM, urea 6 M y 0.5% de HEC. Para establecer el factor de dilución adecuado previo a la inyección, se determinó por triplicado el contenido en proteínas de cada extracto de acuerdo con el procedimiento de Peterson [47]. Para un experimento típico de CZE, en el momento de la inyección los extractos contienen una concentración de proteínas próxima a 2 mg/mL. Finalmente, los extractos se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2.4. Procedimientos de CZE

Los capilares nuevos, una vez cortados, se acondicionaron a 60 °C tal y como se indica a continuación: se hace circular por el interior del capilar una disolución de NaOH 1 M durante 5 min, posteriormente NaOH 0.1 M durante 5 min más, y finalmente agua durante 10 min. Al inicio de cada sesión el capilar se termostatiza a 25 °C y se acondiciona durante 30 min con el tampón electroforético. El electrolito de fondo contiene IDA 50 mM (pH = pI = 2.30 a 25 °C), urea 6 M y 0.5% de HEC (pH final aparente, 3.1). Todos los tampones y las disoluciones se hacen pasar por un filtro de nylon de 0.45 µm de diámetro de poro (Millipore, Bedford, MA, USA). Las muestras se inyectaron en el capilar hidrodinámicamente, aplicando una presión de

0.5 psi durante 3 s. Las separaciones se realizaron aplicando un campo eléctrico de 700 V/cm, que dio lugar a una corriente de 25 μA. La señal se monitorizó a 214 nm. Los tampones isoeléctricos no son totalmente estacionarios bajo la acción de un campo eléctrico, variando su composición con el tiempo [54]. Por ello, las disoluciones tampón situadas en los reservorios anódicos y catódico fueron sustituidas por disoluciones frescas cada cinco inyecciones.

2.5. Análisis estadístico

2.5.1. Análisis exploratorio de datos

Para el análisis exploratorio de la matriz de datos, se emplearon dos técnicas de estadística multivariante, en concreto, el análisis de las componentes principales (PCA), y el diagrama jerárquico de grupos o dendrograma [48]. En PCA, se construye una serie de vectores ortogonales, llamados componentes principales, vectores propios (*eigenvectors*) o autovectores, que son combinaciones lineales de las variables originales. Los autovectores se construyen en orden decreciente del porcentaje de varianza explicada, de tal manera que el primer autovector contiene la mayor varianza de los datos originales posible. El segundo autovector es ortogonal al primero, y contiene la máxima varianza residual posible, y así sucesivamente.

Mediante las proyecciones de las muestras sobre los planos definidos por los tres primeros autovectores tomados de dos en dos, se tienen las mejores representaciones posibles de la estructura interna de la matriz de los datos. Estas representaciones son útiles para interpretar las interrelaciones entre las muestras, esto es, la presencia de correlaciones y grupos. A su vez, se pueden observar las interrelaciones entre las variables, o de éstas con las muestras, mediante la representación de las cargas (*loadings*) o coeficientes de las variables sobre los mismos planos definidos por los primeros autovectores. Antes de usar un PCA, es conveniente autoescalar o estandarizar la matriz de datos, con el fin de dotar del mismo peso a todas las variables manifiestas originales.

Por su parte, el dendrograma es un esquema en el cual se clasifican muestras, o en su caso las variables, de acuerdo con medidas de distancia o similitud, entre ellas. La clasificación se realiza bajo la forma de grupos jerárquicos o *clusters*. Un grupo se genera por la unión entre una muestra y la muestra aislada más próxima, o el grupo más próximo previamente formado. Dos grupos que se unen dan lugar a un grupo de jerarquía superior que reemplaza a los anteriores. Este proceso se repite hasta que sólo queda un único grupo. Los algoritmos usados por el programa difieren de acuerdo con la forma de calcular las similitudes entre los grupos ya formados [49, 50]. Por su parte, la construcción de dendrogramas de variables es útil para obtener información sobre los factores que controlan el sistema, los cuales se pueden inferir a partir de los grupos formados por las variables. En este capítulo, se calcularon los dendrogramas de las muestras en el espacio de las variables, y viceversa (dendrogramas de variables en el espacio de las muestras), usando las distancias euclídeas como medidas de similitud. El estudio se repitió tanto para datos no estandarizados como estandarizados.

2.5.2. Análisis discriminante lineal

El análisis discriminante lineal (LDA) es comúnmente usado para construir modelos capaces de clasificar las muestras en categorías. El LDA se basa en una búsqueda iterativa de los vectores o funciones discriminantes que maximizan la separación entre categorías, y simultáneamente minimizan la varianza dentro de cada categoría [48]. Los vectores discriminantes son combinaciones lineales de las variables originales, y se obtienen en orden decreciente de su poder discriminante, manteniendo la ortogonalidad entre ellos. El objetivo es obtener funciones que permitan clasificar una muestra desconocida dentro de una de las categorías existentes con una cierta probabilidad conocida. El LDA se puede utilizar cuando se conoce previamente la pertenencia de los objetos a las categorías, proporcionando una mejor separación entre las categorías que el PCA. Para observar la separación entre categorías, se representan las muestras en forma de histograma sobre la primera

función discriminante (cuando sólo existen dos categorías), o bien, en forma de diagrama de dispersión sobre el plano formado por las dos primeras funciones discriminantes (cuando existen tres o más categorías).

2.5.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales

El PLS es una técnica de regresión multivariante muy potente, que da lugar a buenos resultados incluso cuando las variables predictoras (o variables X) expresan una información común, es decir, cuando son fuertemente colineales. Para predecir una simple respuesta (o variable Y) mediante el uso de la información suministrada por las n variables X, el PLS construye modelos del tipo:

$$Y = t_1L_1 + t_2L_2 + ...+ t_iL_i +....+ t_nL_n$$

donde las L_i o variables latentes son combinaciones lineales de las variables originales. Se puede construir un modelo PLS diferente usando una, dos, o más variables latentes. Las primeras variables latentes recogen varianza de las variables predictoras o variables X, sin perder correlación entre dichas variables predictoras y la respuesta, mientras que las últimas contienen únicamente ruido aleatorio. Por tanto, el mejor modelo es aquel que explica un gran porcentaje de la varianza total de la matriz de los datos, con un número mínimo de variables latentes. El número óptimo de variables latentes se define en cada caso, para lo cual se suelen utilizar técnicas estadísticas que se agrupan dentro de la denominación común de "validación cruzada".

3. Resultados y discusión

3.1. Definición de las variables predictoras y construcción de la matriz de datos

El conjunto de entrenamiento utilizado para definir las variables predictoras se construyó mediante el análisis de nueve muestras de queso de un origen animal único, tal como se indica en la Tabla 1. Las muestras incluyen quesos puros de vaca (V), cabra (C) y oveja (O). Cada muestra fue analizada por triplicado, y a su vez se inyectaron tres alícuotas de cada una, por lo que el conjunto de entrenamiento o calibración quedó constituido por un total de 81 electroferogramas. En la Figura 1 se muestran los perfiles electroforéticos de tres quesos, elaborados cada uno de ellos con un tipo de leche distinto.

Para poder definir las variables se empleó el programa ELECTRO, elaborado en nuestro laboratorio, que está diseñado para comparar electroferogramas. Además, este programa integra las áreas de los picos, y reduce el electroferograma a un esquema, en el cual los picos son sustituidos por líneas sencillas. Los electroferogramas esquematizados se pueden comparar simultáneamente sobre una pantalla, o bien se imprimen y se comparan sobre el papel. Algunos picos característicos comunes a todas las muestras pueden ser usados como referencia, para corregir pequeños desplazamientos en los tiempos de migración de otros picos. A su vez, los diagramas creados por ELECTRO son excelentes herramientas para seleccionar como variables los picos característicos de cada tipo de leche, así como los picos comunes presentes simultáneamente en dos o tres tipos de leche de distinto origen animal. Se definieron un total de 18 variables, que corresponden a las áreas de los 18 picos característicos indicados en la Figura 1. Se seleccionaron los picos 2 y 14 como valores de referencia sobre la escala de tiempos de migración, para corregir los tiempos de migración de los demás picos.

Tabla 1. Conjunto de muestras de entrenamiento o calibración

Fabricante	Composición, V/C/O (%)[a]	Tiempo de maduración [b]
Don Nuño	100/0/0	B
Edam	100/0/0	A
Cadí	100/0/0	B
Capitol	100/0/0	B
Flor de Esgueva	0/0/100	B
Plantío	0/0/100	A
Roncal I	0/0/100	A
Montesinos	0/100/0	B
Rocinante	0/100/0	A

[a] Porcentajes de leche de vaca (V), cabra (C) oveja (O) declarados por el fabricante.
[b] Tiempo de maduración: bajo (B, queso fresco) y alto (A).

Se obtuvo una excelente similitud entre los perfiles electroforéticos debidos a quesos de un mismo tipo de leche (datos no mostrados), mientras que los quesos elaborados con diferentes tipos de leche dieron lugar a perfiles fácilmente distinguibles entre sí. Así, el pico designado como 1 en la Figura 1 fue característico de los quesos elaborados con leche de vaca, los picos 2, 13 y 14 fueron de mayor intensidad que el resto de los picos para los quesos elaborados con leche de cabra, y los picos 3 y 5-8 fueron particularmente grandes en los quesos de oveja. En su mayoría, los demás picos fueron comunes para todos los quesos, si bien con perfiles diferentes dependiendo del tipo de leche usada en la elaboración del queso. Para aumentar la reproducibilidad, se dividió el área de cada pico seleccionado como variable por la suma de las áreas de los 18 picos de su respectivo electroferograma. A continuación, se estandarizaron todas las variables. Los estudios estadísticos se realizaron con los paquetes de software PARVUS [51] y UNSCRAMBLER [52].

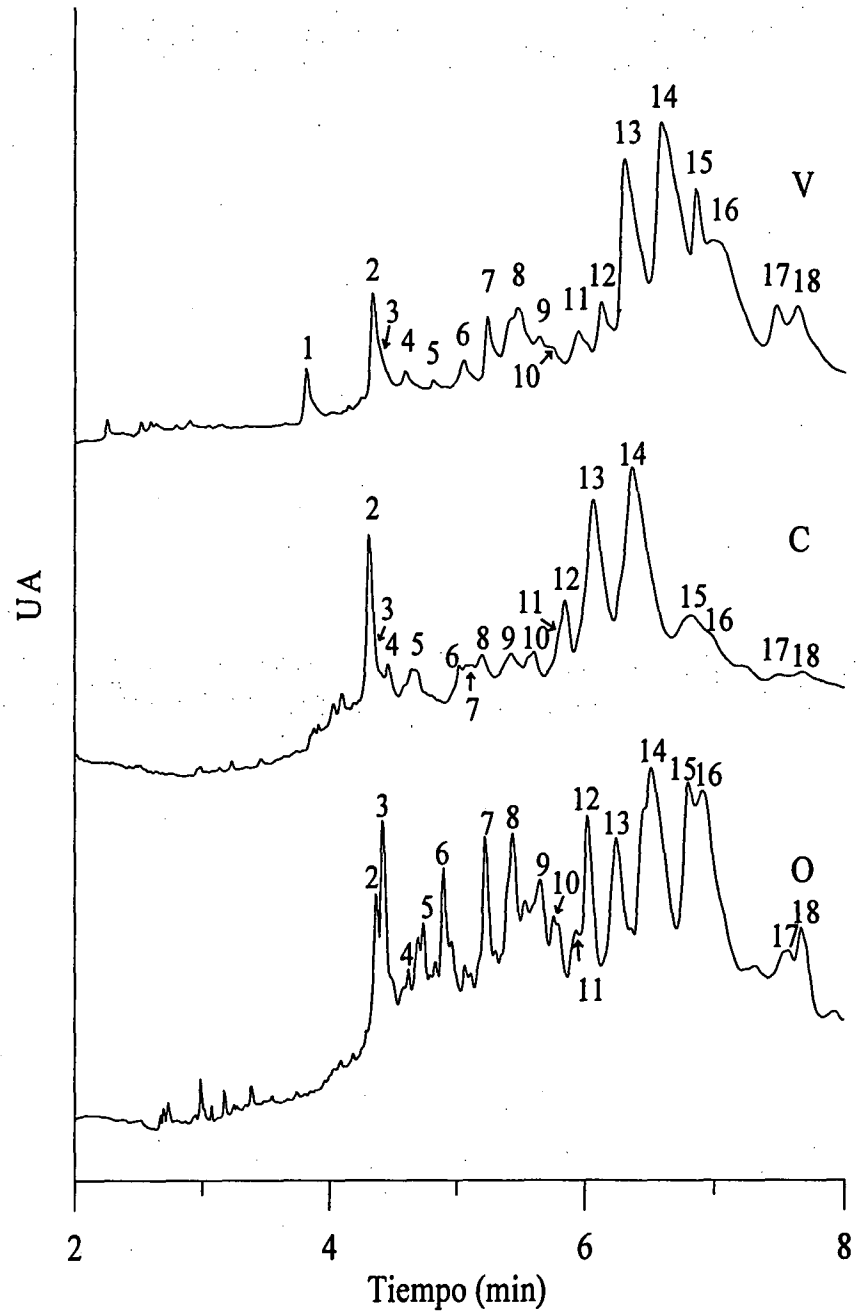


Figura 1. Electroferogramas de quesos de vaca (V), cabra (C) y oveja (O), mostrando los 18 picos seleccionados como variables (60 mUA para cada electroferograma). Las condiciones de trabajo son las indicadas en la sección 2.4.

3.2. Análisis exploratorio de datos mediante PCA

Un primer PCA mostró tres grupos, que corresponden a las tres categorías relativas al origen genético: V, C, O. Dos de estos 81 electroferogramas (una inyección de Roncal I y una de Montesinos) fueron aberrantes y, por tanto, se eliminaron en los estudios posteriores. El diagrama doble de la Figura 2 (*biplot*) muestra las proyecciones de los objetos (puntuaciones o *scores*), y las cargas o coeficientes de las variables (*loadings*), en el plano de los dos primeros autovectores. Estos dos autovectores explicaron el 36 y 19% de la varianza total, respectivamente; por tanto, la Figura 2 mostró el 55% de la varianza total. Además, el diagrama doble muestra que algunas variables forman grupos. Así, las variables 3, 4, 5, 7, 9 y 10 constituyen un grupo asociado con elevados contenidos en leche de oveja, y las variables 1, 13, 14 y 15 forman un grupo asociado a altos contenidos en leche de vaca. Finalmente, un valor alto de la variable 2 indica un elevado contenido en leche de cabra. Una característica interesante de la Figura 2 es la separación de las muestras de C y O no tan sólo por la variedad genética, sino también simultáneamente por el tiempo de maduración. Como se observa en la figura, cada una de las categorías C y O está a su vez dividida en dos subcategorías, una conteniendo las muestras con tiempos de maduración bajos (B), y otra las muestras con tiempos de maduración altos (A). En cambio, atendiendo al tiempo de maduración, no se observó separación de las muestras de la categoría V sobre ninguno de los planos definidos por los tres primeros autovectores tomados de dos en dos. La separación de las muestras de cabra y oveja en función del tiempo de maduración mejoró mediante PCAs realizados de forma independiente para las correspondientes categorías (resultados no mostrados).

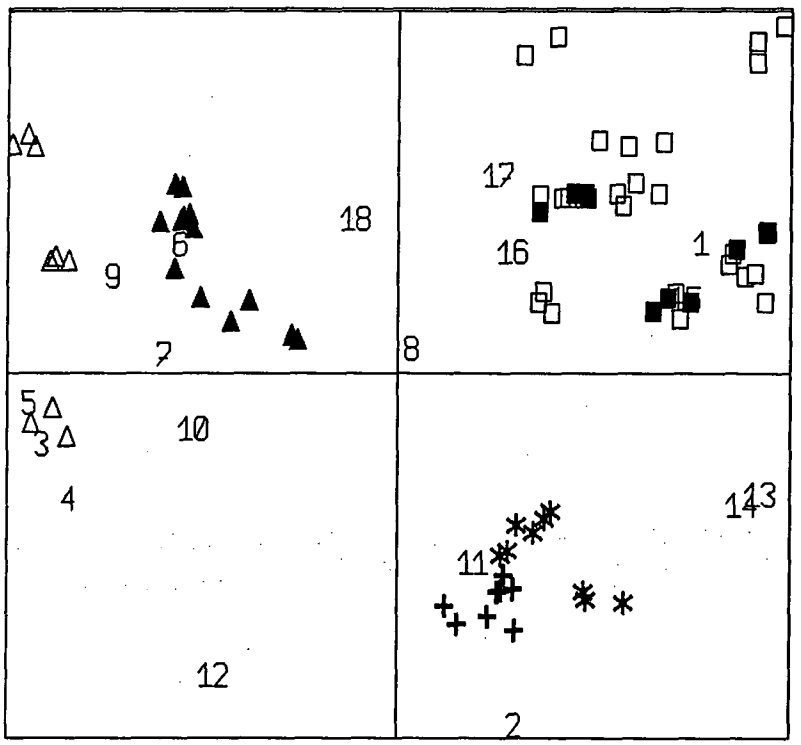


Figura 2. Diagrama doble sobre el plano formado por los 2 primeros autovectores. Los símbolos utilizados para representar las muestras del conjunto de entrenamiento de la Tabla 1 son: quesos de vaca de bajo (□) y alto (■) tiempo de maduración; quesos de cabra de bajo (+) y alto (*) tiempo de maduración; quesos de oveja de bajo (Δ) y alto (▲) tiempo de maduración. Los números representan las variables originales, ubicadas de acuerdo a sus respectivas cargas sobre los autovectores primero (eje de abscisas) y segundo (eje de ordenadas).

3.3. Análisis exploratorio de datos utilizando dendrogramas

Un dendrograma de las muestras las agrupó nítidamente dentro de sus tres categorías genéticas: V, C y O (resultados no mostrados). Además, se observó la separación de las muestras de las categorías C y O en función del tiempo de maduración (categorías B y A). Por su parte, tal como se observa en la Figura 3, el dendrograma de las variables muestra los siguientes grupos: (i) el grupo de variables características de la categoría V, que está formado principalmente por las variables 1, 13-15 y 17; (ii) la variable 2 aislada, que es característica de los quesos de cabra; y (iii) el grupo de variables características de la categoría oveja, donde se incluyen las variables 3-6 y 9-10. Estos grupos concuerdan con las correlaciones observadas en los estudios realizados mediante PCA.

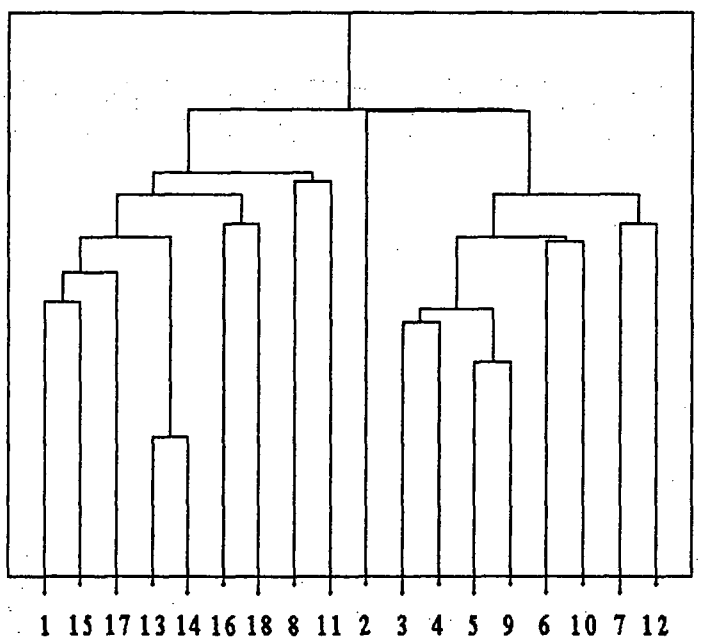


Figura 3. Dendrograma de las variables mostrando los grupos de variables asociadas a las categorías vaca (variables 1, 13-15 y 17), oveja (variables 3-6 y 9-10), y la variable aislada 2, característica de los quesos de cabra.

3.4. Análisis discriminante lineal

Las muestras del conjunto de entrenamiento se utilizaron para construir varios modelos de LDA. Para ello, y en primer lugar, las muestras se reconocieron como pertenecientes a las categorías V, C y O. Luego, cada modelo se aplicó tanto al conjunto de entrenamiento como a unas pocas muestras de un conjunto de evaluación, constituido por muestras binarias V/O y ternarias V/C/O. En la Figura 4 se muestra una proyección de las muestras del conjunto de entrenamiento (tres inyecciones por muestra) sobre el plano de las dos funciones discriminantes. Las tres categorías genéticas se observan claramente diferenciadas; de hecho, el LDA clasificó correctamente todas las muestras del conjunto de entrenamiento. Las proyecciones de las muestras binarias y ternarias del conjunto de evaluación ocuparon posiciones intermedias, como era de esperar por tratarse de mezclas y no de categorías "puras" (resultados no mostrados).

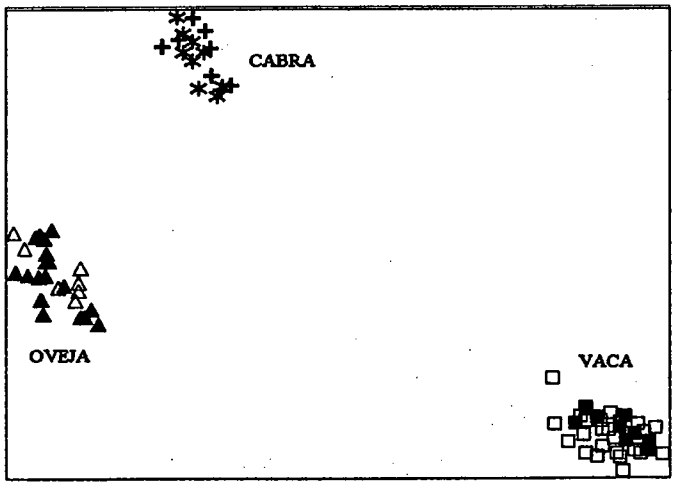


Figura 4. Gráfico de LDA de las categorías V, C y O: proyección de las muestras del conjunto de entrenamiento sobre los 2 primeros vectores discriminantes (los símbolos son los indicados en la Figura 2).

Se construyó otro LDA asignando las muestras a sus respectivas categorías de tiempo de curado, B o A. Con este modelo, todas las muestras de la categoría B resultaron clasificadas en un grupo único, independientemente de su origen animal, mientras que las muestras A de cabra y A de oveja resultaron separadas en grupos bien diferenciados (Figura 5). Desafortunadamente, las muestras A de vaca no se separaron de las B de vaca. Sin embargo, como se muestra en la Figura 6, partes A-C, se consigue una completa separación de las categorías del tiempo de maduración cuando se construye un modelo LDA independiente para cada una de las tres categorías genéticas. En estas representaciones se elimina la varianza debida al origen genético, lo que exalta la separación debida al tiempo de curado. Por lo tanto, es posible separar simultáneamente todas las categorías, en función tanto del origen genético como del tiempo de maduración, mediante la construcción independiente de dos modelos de LDA, uno para distinguir el origen genético, y el otro para clasificar las muestras de acuerdo con el tiempo de maduración. La separación de todas las categorías está garantizada si se utilizan ambos modelos secuencialmente.

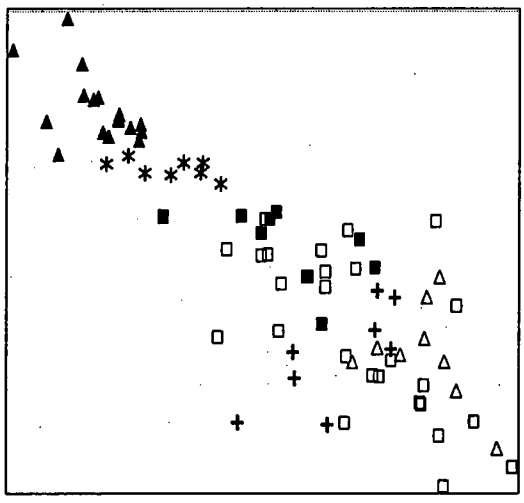


Figura 5. Gráfico de LDA de las categorías del tiempo de maduración, B y A. La proyección de las muestras del conjunto de entrenamiento se realiza sobre los 2 primeros vectores discriminantes (los símbolos son los indicados en la Figura 2).

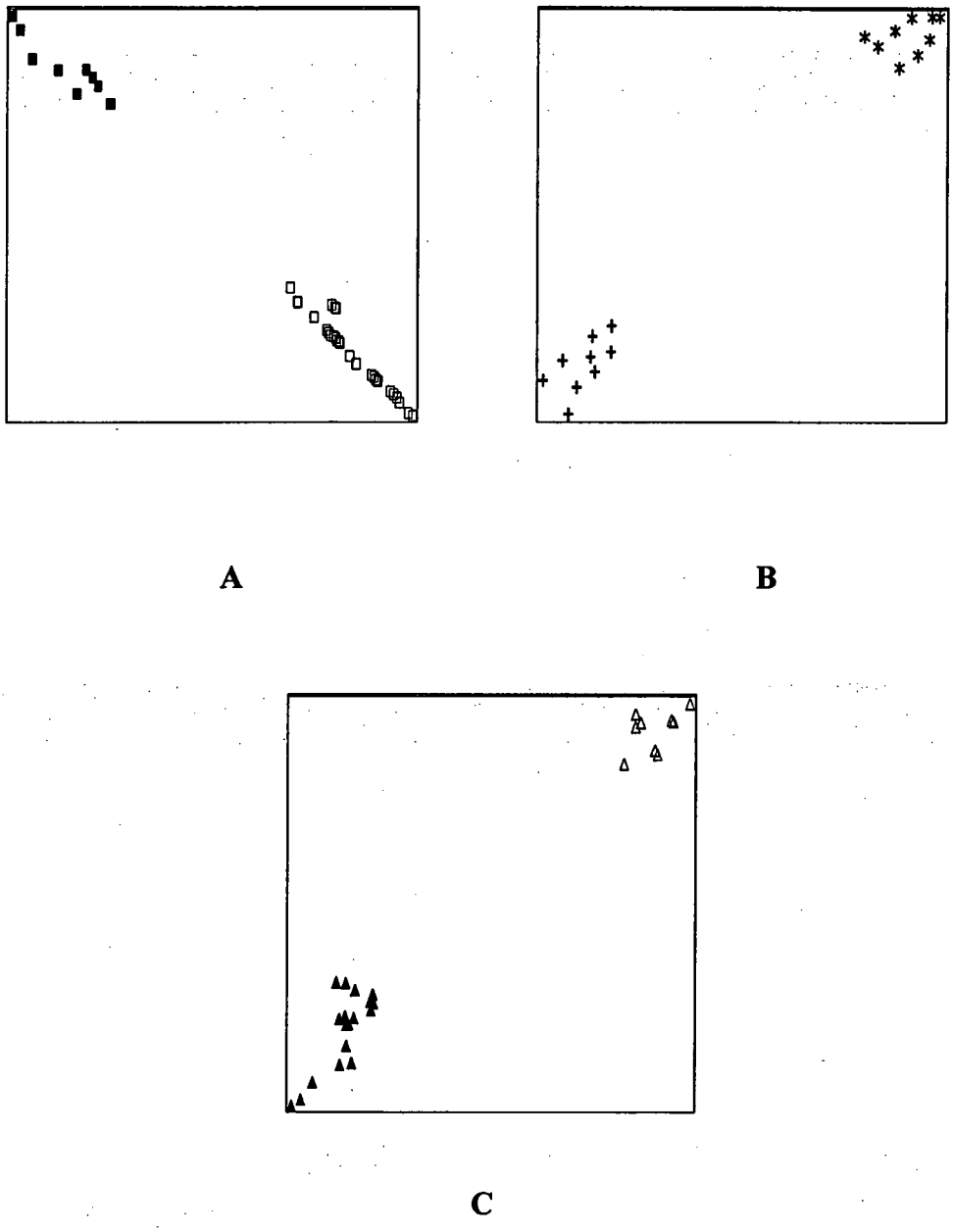


Figura 6. Gráficos de LDA de las categorías del tiempo de curado, B y A. Proyección de las muestras de vaca (parte A), cabra (parte B) y oveja (parte C) sobre el plano definido por los dos primeros vectores discriminantes para modelos de LDA construidos separadamente para las categorías V, C y O (los símbolos son los indicados en la Figura 2).

3.5. Construcción de los modelos de regresión de PLS

En función de los resultados comentados anteriormente, se construyó un modelo de regresión de PLS capaz de predecir las siguientes variables: (i) el contenido en leche de vaca (V%) en quesos presumiblemente puros de cabra y oveja, así como en quesos binarios y ternarios; y (ii) el tiempo de maduración (Rt) en quesos, previamente clasificados por su origen genético. Los modelos fueron evaluados por comparación de las predicciones realizadas sobre el conjunto de entrenamiento con los valores declarados. Para ello, se definieron las siguientes variables de escala que se adicionaron a la matriz de datos: (i) los porcentajes de leche de vaca (V%) y de leche de cabra (C %) (dos variables son suficientes para establecer la composición de quesos binarios y ternarios, por lo que el porcentaje de leche de oveja no se incluyó); y (ii) el tiempo de maduración, el cual se introdujo como dos posibilidades extremas, 0 o 100, para las categorías de bajo y alto grado de maduración, respectivamente (no fue posible disponer de información más detallada sobre los tiempos de maduración de las muestras del conjunto de entrenamiento).

Las muestras de calibrado, así como las variables predictoras empleadas en la construcción de cada modelo de regresión de PLS se muestran en la Tabla 2. En primer lugar, sólo las 18 áreas de picos fueron incluidas como variables X para predecir la concentración de leche de vaca (modelo 1, Tabla 2). Como se observa en la Tabla 2, se obtuvieron buenas predicciones con desviaciones estándar del orden del 6-7%. Los resultados no se mejoraron por la inclusión del tiempo de maduración como una variable predictora adicional (modelo 2). La precisión y exactitud mejoraron ligeramente cuando se crearon dos modelos de regresión de PLS diferentes, uno para quesos con tiempos de maduración bajos y otro para altos (modelos 3 y 4, respectivamente).

Tabla 2. Predicción del contenido de leche de vaca y tiempo de maduración empleando diferentes modelos de PLS.

Modelo nº	Muestras [a]	Variables predictoras [b]	Variable respuesta	Nº óptimo de variables latentes	Varianza explicada,%	Predicho ± s [c], % (nº de datos)	
						Ref. 100 %	Ref. 0 %
1	Todas	18	V%	4	97.9	99.0 ± 7.3 (36)	0.8 ± 6.2 (43)
2	Todas	18+Rt	V%	4	97.9	99.0 ± 7.6 (36)	0.9 ± 6.1 (43)
3	B	18	V%	4	98.2	99.4 ± 6.7 (27)	0.9 ± 4.4 (17)
4	A	18	V%	2	98.5	99.1 ± 4.7 (9)	0.3 ± 5.0 (26)
5	Todas	18	Rt	5	52.6	78 ± 28 (35)	18 ± 22 (44)
6	Todas	18+V%+C%	Rt	6	54.3	79 ± 27 (35)	17 ± 22 (44)
7	V	18	Rt	3	15.8	48 ± 6 (9)	17 ± 23 (27)
8	C	18	Rt	2	97.5	99.2 ± 6.7 (9)	0.9 ± 7.2 (8)
9	O	18	Rt	3	97.0	99.3 ± 5.0 (17)	1.3 ± 9.4 (9)

[a] Muestras incluidas en el conjunto de calibración: todas las muestras indicadas en la Tabla 1 (Todas); de éstas, solo muestras de bajo (B) o alto (A) tiempo de maduración, o solamente muestras puras de vaca (V), cabra (C) u oveja (O).

[b] Variables usadas para construir el modelo: solamente las áreas normalizadas de los 18 picos, o éstas más el tiempo de maduración (Rt), o más el porcentaje de vaca (V%) y cabra (C%).

[c] Desviación estándar.

Tabla 3. Predicción del contenido de leche de vaca y del tiempo de maduración en las muestras del conjunto de evaluación usando diferentes modelos de PLS.

Fabricante	Composición y tiempo de maduración	Variable Respuesta	Modelo nº.	Predicho ± s (nº. de datos)	Referencia, %
Entrepinares	V/C/O, A	V%	1 4	56 ± 3 (8) 43 ± 4 (8)	70-90%[a]
Puente Cesta	V/C/O, A	V%	1 4	54 ± 4 (6) 35 ± 4 (6)	50-70%[a]
Flor de Ronda I	V/C, B	V%	1 3	77.9 ± 1.6 (6) 90 ± 3 (6)	80-95%[a]
Flor de Ronda II	V/C, A	V%	1 4	73 ± 4 (9) 57.6 ± 1.3 (9)	80-95%[a]
Roncal II	O, A	V%	1 4	-4 ± 8 (9) -7 ± 5 (9)	No detectado[a]
Lácteas Toledo I	C, A	V%	1 4	-8 ± 3 (5) -8 ± 8 (5)	Ausente[b]
Lácteas Toledo II	V/C/O, A	V%	1 4	53 ± 5 (5) 36 ± 4 (5)	60%[b]
Roncal II	O, A	Rt	9	117 ± 9 (9)	100[c]
Lácteas Toledo I	C, A	Rt	8	120 ± 13 (5)	100[c]

[a] Obtenido en otro laboratorio por SDS-PAGE según el procedimiento de la ref. [53].
[b] Declarado por el fabricante.
[c] Valor de referencia usado en este trabajo para codificar las muestras de tiempo de maduración alto.

Por otra parte, con el objeto de estudiar la capacidad del procedimiento para predecir el tiempo de curado, se construyeron los modelos 5-9 de la misma Tabla 2. No se obtuvieron resultados satisfactorios usando todas las muestras y las áreas de los 18 picos en la predicción del tiempo de curado (modelo 5). Esto se atribuyó a la baja separación de las categorías B y A en los quesos de leche de vaca, lo que está de acuerdo con los resultados anteriormente obtenidos con el PCA y el dendrograma. Además, no se apreciaron ventajas por incluir los contenidos en leche de cabra y de oveja como variables predictoras (modelo 6), y los errores se incrementaron cuando se construyó un modelo de PLS para las muestras de vaca sin tener en cuenta las categorías C y O (modelo 7). Finalmente, las predicciones mejoraron enormemente cuando las categorías C y O fueron tratadas por separado (modelos 8 y 9, respectivamente). Con estos últimos modelos, se predijo el tiempo de maduración en los quesos de cabra y oveja con desviaciones estándar del orden del 5-9%.

3.6. Predicciones del contenido en leche de vaca y tiempo de maduración mediante regresión de PLS

Los mejores modelos obtenidos (Tabla 2) fueron utilizados para predecir el porcentaje de leche de vaca y el tiempo de maduración en algunas muestras de evaluación adicionales, incluyendo quesos puros, binarios y ternarios. Se extrajeron y analizaron por triplicado dos o tres porciones de cada muestra de evaluación. Los electroferogramas se trataron del mismo modo como se hizo previamente con las muestras de calibración. Los resultados, comparados con los valores de referencia declarados por el fabricante, u obtenidos por otro laboratorio mediante SDS-PAGE [53], se muestran en la Tabla 3. El modelo 1 (predicción de V% sin distinguir entre muestras B y A) y el modelo 3 (predicción V% en muestras B) proporcionaron predicciones satisfactorias de V% en términos de precisión y exactitud. Sin embargo, el modelo 4 (predicción de V% en muestras A) proporcionó valores bajos de V%. Los modelos 8 y 9 clasificaron correctamente las muestras de C y O, dentro de su categoría, que era la A.

4. Conclusiones

Se ha demostrado que un electroferograma de CZE, obtenido con la fracción proteica soluble en etanol-agua, contiene la suficiente información como para poder clasificar muestras de queso de acuerdo con su origen genético y tiempo de maduración. Sobre la base de estos electroferogramas, y utilizando regresión multivariante por el método de PLS, se pueden predecir los contenidos de leche de vaca en quesos de cabra y oveja presumiblemente puros, así como en mezclas binarias o ternarias, con una desviación estándar próxima al 6-7%. Este resultado incluye quesos de bajo y alto grado de maduración. También se puede estimar el tiempo de maduración en quesos elaborados con leche de cabra y oveja.

5. Referencias

1. J.J. Breen y P.E. Robinson, "Environmental Application of Chemometrics", ACS symposium Serie 292, American Chemical Society, Washington, DC, 1985.
2. M. Ramos y M. Juarez, Intern. Dairy Fed. Bull., 202 (1986) 175.
3. L. Pellegrino, I. De Noni, A. Tirelli y P. Resmini, Sci. Tec. Latt.-Cas., 42 (1991) 87.
4. I. De Noni, A. Tirelli y F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 47 (1996) 7.
5. L. Pellegrino, A. Tirelli y F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 43 (1992) 297.
6. E. Molina, M. Ramos y P. Martin-Alvarez, Z. Lebensm.Unters. Forsch., 201 (1995) 331.
7. J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart y D. Coomans, J. Ass. Off. Anal. Chem., 60 (1977) 1382.
8. A. Marcos, M.A. Esteban, F. Leon y J. Fernández-Salguero, J. Dairy Sci., 62 (1979) 892.
9. K. Dewettinck, S. Dierckx, P. Eichwalder y A. Huyghebaert, A., Lait, 77 (1997) 77.
10. K. Kaminogawa, T.R. Yan, N. Azuma, y K. Yamauchi, J. Food Sci., 51 (1986) 1253.
11. R. Marsilli y J. Dairy Sci., 68 (1985) 3155.
12. A.M. Pham y S. Nakai, J. Dairy Sci.,67 (1984) 1390.
13. G.F. Amantea, B.J.G. Skura y S. Nakai, J. Food Sci., 41 (1986) 912.
14. C. Polo, M. Ramos y R. Sánchez, Food Chem., 16 (1985) 85.
15. G. Santa-Maria y M.Ramos, Food Chem., 19 (1986) 225.
16. A.G. Ruiz, L. Cabezas, P.J. Martin-Alvarez y D. Cabezudo, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 206 (1998) 382.
17. I. Recio, L. Amigo y R. Lopez-Fandiño, J. Chromatogr A, 697 (1997) 231.
18. J. Otte, K.R. Kristiansen, M. Zakora y K.B. Qvist, Neth. Milk Dairy J., 48 (1994) 81.

19. J. Otte, L. Midtgaard y K.B.Qvist, Milchwissenschaft, 50 (1994) 75.
20. I. Recio,E. Molina,M. Ramos y M. De Frutos., Electrophoresis, 16 (1995) 654.
21. M. De Frutos, E. Molina y L. Amigo, Milchwissenschaft, 51 (1996) 374.
22. I. Recio, M. De Frutos, A. Olano y M. Ramos, J. Agr. Food Chem., 44 (1996) 3955.
23. G.R. Paterson, D.E. Otter y J.P. Hill, J. Dairy Sci., 78 (1995) 2637.
24. G.R. Paterson, J.P. Hil y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 105.
25. N.M. Kinghorn, G.R. Paterson y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 371.
26. M. Strickland, B.C. Weimer y J.R. Broadbent, J. Chromatogr. A, 731 (1996) 305.
27. I. Recio, M.L. Perez-Rodriguez y M. Ramos, Amigo, J. Chromatogr. A, 768 (1997) 47.
28. J.F. Fairise y P. Cayot, J.Agric. Food. Chem., 46 (1998) 2628.
29. N. De Jong, S. Visser y C. Olieman, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 207.
30. A. Cifuentes, M. De Frutos y J.C. Diez-Masa, J. Dairy Sci., 76 (1993) 1870.
31. M. Kanning, M. Casella y C. Olieman, LC-GC Int., 6 (1993) 701.
32. J. Van Riel y C. Olieman, Electrophoresis,16 (1995) 529.
33. N.M. Kinghorn, C.S. Norris, G.R. Paterson y D.E. Otter, J. Chromatogr.A, 700 (1995) 111.
34. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro, P.M. Toppino y V. Denti, J. Chromatogr. A, 721 (1996) 345.
35. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro y Greppi, Milchwissenschaft, 51 (1996) 616.
36. I. Recio y C. Olieman, Electrophoresis, 17 (1996) 1228.
37. B. Vallejo-Cordoba, J. Capil. Electrophor., 4 (1997) 219.
38. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska y M. Masci, Ital. J. Food Sci. 10 (1998) 317.
39. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska y M. Masci, Ital. J. Food Sci., 10 (1998) 127.

40. A.V. Stoyanov y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 790 (1997) 169.
41. P.G. Righetti y F. Nembri, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 203.
42. A.Bossi y P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 2012.
43. C. Gelfi, M. Perego y P.G. Righetti, Electrophoresis, 17 (1996) 1470.
44. A.V. Stoyanov, C. Gelfi y P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 717.
45. L. Capelli, F. Forlani, F. Perini, N. Guerrieri, P. Cerletti y P.G. Righetti, Electrophoresis, 19 (1998) 311.
46. P.G. Righetti, E. Olivieri y A. Viotti, Electrophoresis, 19 (1998) 1738.
47. G.L. Peterson, Anal. Biochem., 83 (1977) 346.
48. D.L. Massart, B.G.M. ,Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte y L. Kaufman, Chemometrics: a Textbook, Elsevier, Amsterdam, 1989.
49. D.L. Massart y L. Kaufman, The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis, Wiley-Interscience, New York, 1983.
50. P. Willett, Similarity y Clustering in Chemical Information System, Research Studies Press, Letchworth, Reino Unido, 1987.
51. M. Forina, S. Lanteri, C. Armanino, R. Leardi y G. Drava, PARVUS: An extendable package of programs for data explorative analysis, classification and regression analysis, Universidad de Genova, 1998.
52. Unscrambler 7.01 User´s Guide 1998 CAMO ASA, Trondheim, Noruega.
53. L. Amigo, G. Santa-María, M. González-Llano y M. Ramos, Polyacrilamide gel electrophoresis of whey proteins in cheese made from milk of different species, XII Int. Dairy Congress, La Haya, 152, 1986.
54. A. Bossi, E. Olivieri, L. Castelleti, C. Gelfi, M. Hamdan y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 853 (1999) 71.

ANEXO V

DETERMINACIÓN DE LECHE DE VACA EN QUESOS NO BOVINOS Y MEZCLAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR DE LAS PROTEÍNAS SÉRICAS EN TAMPONES ÁCIDOS ISOELÉCTRICOS

Traducción del Capítulo VIII, correspondiente al artículo publicado en: Journal of Chromatography A, 878 (2000) 261-271, José Manuel Herrero-Martínez, Ernesto F. Simó-Alfonso, Guillermo Ramis-Ramos, Cecilia Gelfi y Pier Giorgio Righetti.

Resumen

Se ha desarrollado un método mejorado para la determinación de leche de vaca en quesos no bovinos basado en la separación electroforética de las proteínas del suero en tampones ácidos isoeléctricos. Se han ensayado dos electrolitos de fondo (BGEs): (i) una disolución que contiene ácido iminodiacético 50 mM (pH = pI = 2.3 a 25ºC), hidroxietilcelulosa al 0.5%, Tween 20 al 0.1% y urea 6 M (pH aparente 3.1), utilizando un campo eléctrico de 300 V/cm para la separación de las α-lactoalbúminas (α-LAs); (ii) un BGE con la misma composición, pero con un 10% de Tween 20 para el fraccionamiento de las ß-lactoglobulinas (ß-LGs) aplicando un campo eléctrico de 450 V/cm. Los tensioactivos presentan un efecto discriminante sobre la retención de las proteínas α-LAs y ß-LGs bovinas, que es debido a la diferente estabilidad de los complejos de asociación proteína-tensioactivo. La presencia de tensioactivos en el BGE es necesaria para separar estas dos proteínas, que aparecen en los electroferogramas en forma de picos de pequeño tamaño, y que proceden de la degradación de las caseínas durante la maduración del queso. Se han establecido nuevas ecuaciones a partir de la relación del área (o altura) de las α-LAs o ß-LGs bovinas con respecto al área (o altura) de las α-LAs o ß-LGs ovinas o caprinas. Relaciones de este tipo se utilizan habitualmente para determinar el porcentaje de leche de vaca en productos lácteos, sin embargo, los cocientes utilizados tradicionalmente presentan notables inconvenientes, tales como la no linealidad de las

representaciones, con el agravante de que la pendiente aumenta conforme se incrementa el contenido en leche de vaca, y de que los límites de confianza resultan excesivamente grandes cuando el contenido en leche de vaca es alto y la relación de áreas (o alturas) de picos tiende asintóticamente a infinito. Con los nuevos procedimientos y expresiones propuestas, las relaciones son lineales, y se pueden determinar contenidos de leche de vaca tan bajos como un 1% en quesos de cabra y oveja. Los procedimientos aquí propuestos proporcionan menores límites de detección, y son más económicos y rápidos que otras metodologías descritas en la bibliografía, pudiendo ser por tanto, fácilmente aplicados al control sistemático de calidad de quesos binarios y ternarios.

Palabras clave: Queso; Análisis de alimentos; Proteínas; Proteínas del suero

1. Introducción

Los productos lácteos constituyen uno de los componentes mayoritarios de la alimentación humana, estando protegidos en casi todos los países por leyes específicas. De acuerdo con la ley, el origen animal de la leche empleada en la manufacturación de quesos debe ser declarada por el productor; sin embargo, la adulteración de quesos de oveja y/o de cabra con leche de vaca es relativamente habitual, lo que es debido a: (i) fluctuaciones estacionales en la disponibilidad de la leche de cabra y oveja; (ii) el mayor precio de la leche de cabra, y especialmente la de oveja, en comparación a la leche de vaca; y (iii) la oportunidad de usar la superproducción ocasional de leche de vaca sin pérdida de beneficios. Por lo tanto, es importante disponer de métodos que permitan determinar la composición de la leche, quesos y otros productos lácteos de una forma fiable, rápida y sensible.

Este problema ha sido abordado mediante técnicas de inmunoensayo (ELISA), electroforesis en capa de gel y cromatografía líquida. Richter y col. [1] desarrollaron una técnica ELISA competitiva indirecta para análisis de leche, basada en la evaluación

de las caseínas y glicomacropéptidos. Beer y col. [2] también usaron ELISA para estimar ß-lactoglobulinas en leche.

El IEF ha sido utilizado para determinar tanto proteínas del suero [3-5] como caseínas [6, 7]. Molina y col. [8] predijeron los porcentajes de leche de vaca, cabra y oveja en quesos españoles mediante electroforesis en capa de gel de poliacrilamida de las proteínas séricas, y Ramos y Juárez [9] evaluaron la aplicabilidad de la electroforesis y del inmunoensayo en mezclas de leches. Tanto ELISA como la electroforesis en gel proporcionan una valiosa información semicuantitativa, pero son lentas y laboriosas, y no pueden detectar cantidades de leche de vaca relativamente pequeñas en productos de cabra y oveja. Se han empleado diversas técnicas de cromatografía líquida (fase inversa, intercambio iónico y exclusión) para evaluar proteínas séricas [10-12]. La HPLC ha sido empleada para determinar leche de vaca en mozzarella de búfalo [13], así como en quesos de cabra [14] y de oveja [15]. La cromatografía ha demostrado ser una valiosa técnica cuantitativa para el análisis de proteínas en productos lácteos; sin embargo, los tiempos de separación suelen estar comprendidos entre 30 y 50 min, lo que puede resultar excesivo para su utilización en control sistemático de calidad.

Diversos estudios han demostrado que la electroforesis capilar (CE) es una técnica adecuada para el análisis de proteínas lácteas [16], utilizando para ello capilares no recubiertos [17-27] y recubiertos [28-38]. Cattaneo y col. [34] han demostrado la capacidad de una modalidad de CE, la CZE, para determinar hasta un 8% de leche de vaca en mezclas de leches de diverso origen animal. Cartoni y col. [37,38], empleando capilares metilsilanizados, han determinado hasta un 2% de leche de vaca en quesos de oveja y búfalo.

Righetti y col. [39-45] han desarrollado procedimientos rápidos de CZE usando tampones isoeléctricos, los cuales debido a su reducida conductividad, son compatibles con elevados gradientes de voltaje, obteniéndose altas resoluciones con bajos tiempos de migración. Estos autores han usado tampones isoeléctricos ácidos

para separar péptidos [40, 41], oligonucleótidos [42, 43] y proteínas presentes en harina [44] y maíz [45].

Nosotros desarrollamos aquí un procedimiento para la rápida identificación y cuantificación de leche de vaca en quesos de cabra y oveja en base a la separación mediante CZE de las proteínas séricas. Se emplean tampones isoeléctricos conteniendo ácido iminodiacético y diferentes concentraciones de un tensioactivo no iónico (Tween 20).

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

El ácido iminodiacético (IDA), urea y los estándares de las proteínas bovinas α-lactoalbúmina (α-LA) y ß-lactoglobulinas (ß-LGs) de las variedades genéticas A y B se obtuvieron de Sigma (St Louis, MO, USA). Los estándares de las proteínas α-LA y ß-LG caprinas y ovinas se purificaron en el laboratorio mediante isoelectroenfoque en capa de gel. El ácido acético y el tris (hidroximetil)aminometano (Tris) se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza). La hidroxietilcelulosa (HEC, con una masa molecular media de 27000) se obtuvo de Polysciences (Warrington, PA, USA). Se preparó un tampón conteniendo ácido acético 3 M y la necesaria cantidad de Tris 2 M para alcanzar pH 4.6. Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA).

2.2. Aparatos

Los capilares no recubiertos de sílice fundida (33.5 cm × 50 μm I.D. × 375 μm O.D.)se obtuvieron de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Los experimentos de CZE se llevaron a cabo en un sistema de electroforesis capilar HP^{3D} (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector espectrofotométrico de fila de diodos.

2.3. Origen y preparación de muestras

Las muestras de quesos de vaca, cabra y oveja de composición garantizada, incluyendo tanto quesos de un único origen animal, como mezclas binarias y ternarias, fueron suministradas por Mercadona S.A. y Lácteas Toledo S.A. (España). Los quesos de un origen animal garantizado y único se emplearon para preparar diferentes mezclas binarias y ternarias que fueron usadas como estándares. Para ello, se usaron quesos de vaca, cabra y oveja, tanto frescos como curados, procedentes de diversos fabricantes. También se emplearon, como estándares y para la evaluación de modelos de regresión, otros quesos elaborados con mezclas binarias y ternarias de leches de diverso origen animal. Para estos últimos quesos, se dispuso además de su composición proporcionada por el fabricante, o bien, obtenida mediante análisis por SDS-PAGE (Tabla 1). La preparación de las muestras se realizó mediante un método similar al propuesto por Pellegrino y col. [14], pero con algunas modificaciones. El procedimiento es el siguiente: una porción de 0.5 g de queso se mezcla con 1 ml de agua destilada, y se agita a temperatura ambiente durante 5 min con ayuda de un mezclador *vortex*. Los extractos se centrifugan a 12000 rpm (16500 *g*) durante 15 min a 4°C. Se toma una alícuota de 500 µl del sobrenadante, se diluye con 250 µl de tampón ácido acético-Tris de pH 4.6, se deja reposar durante 20 min, y de nuevo se centrifuga durante 15 min. La desalinización y preconcentración de las muestras se lleva a cabo mediante membranas Microcon (Amicron, Millipore, Bedford, MA, USA) de corte molecular 10000 Mr. Tras la centrifugación de los tubos Microcon a 8000 rpm (11000 *g*) durante 30 min, los extractos se almacenan a -20°C hasta su uso.

Tabla 1. Contenidos de leche de vaca encontrados y declarados (en porcentajes) para una serie de quesos españoles comerciales.

Fabricante [a]	Referencia	Hallado por α-LAs	Hallado por β-LGs
Entrepinares (A)	70-90 [b]	73 ± 3	67 ± 5
Puente Cesta (A)	50-75 [b]	60 ± 2	57 ± 4
Flor de Ronda (B)	80-95 [b]	92 ± 3	90 ± 6
Flor de Ronda (A)	80-95 [b]	96 ± 3	92 ± 6
Roncal (A)	Puro de oveja [c]	ND [d]	ND [d]
Don Bernardo (A)	Puro de oveja [c]	10 ± 2	8 ± 4
Alquerías del Niño Perdido (A)	Puro de cabra [c]	30 ± 3	28 ± 5
Lácteas Toledo (B)	Puro de cabra [c]	ND [d]	ND [d]
Lácteas Toledo (A)	60 [c]	60 ± 2	55 ± 4

[a] Tiempo de maduración entre paréntesis: B, queso fresco; A, queso curado.

[b] Obtenido en otro laboratorio por SDS-PAGE de acuerdo con el procedimiento de la ref. [4].

[c] Declarado por el fabricante.

[d] No detectado.

2.4. Procedimientos CZE recomendados

Los capilares nuevos se acondicionan a 60°C utilizando las disoluciones y tiempos siguientes: NaOH 1 M durante 5 min, NaOH 0.1 M por 5 min más y finalmente se pasa agua durante 10 min. Al inicio de cada sesión, el capilar se acondiciona con el BGE a 25°C durante 30 min. No se observó una alteración de la línea base usando un tiempo de acondicionado de tan sólo 2 min entre inyecciones sucesivas. Se recomiendan los BGEs y valores de campo eléctrico siguientes:

(i) Para la separación de α-LAs: IDA 50 mM (pH = pI = 2.3 a 25 °C), HEC al 0.5%, Tween 20 al 0.1% y urea 6 M (pH aparente 3.1); E = 300 V/cm.

(ii) Para la separación de ß-LGs se recomienda el mismo BGE, si bien incrementando la concentración de Tween 20 hasta el 10%; E = 450 V/cm.

Todos los tampones y muestras se forzaron mediante presión a través de filtros Millipore de 0.45 µm de diámetro de poro, y se inyectaron de forma hidrodinámica a 50 mbar durante 3 s. La señal se monitorizó a 214 nm.

3. Resultados y discusión

3.1. Separación de las α-LAs de diferente origen animal

Inicialmente se empleó un BGE que contenía IDA 50 mM, HEC al 0.5% y urea 6 M, y se aplicó un campo eléctrico de 700 V/cm. Los electroferogramas de las fracciones de quesos curados de un origen animal único (fracción retenida por las membranas Microcon) se muestran en la Figura 1, partes A-C. Los picos de las α-LAs y de las ß-LGs se identificaron, en todos los casos, mediante adición a los extractos de estándares de las proteínas séricas. Los quesos frescos dieron lugar a electroferogramas similares, a los obtenidos con quesos curados con los mismos picos principales, si bien, con una línea base más sencilla. Se estudió la posible pérdida de las proteínas a través de las membranas Microcon inyectando también los filtrados; en ningún caso se observaron en los filtrados picos de α-LA y ß-LG (electroferogramas no mostrados) lo que indicó que las proteínas quedaban retenidas cuantitativamente por las membranas. Además, la fracción retenida se inyectó diluida al 50% en agua. Las áreas de los picos disminuyeron en u n 50%, lo que indica la ausencia de posibles efectos no lineales, tales como los asociados a la viscosidad de la muestra.

Para las muestras de cabra y oveja, las α-LAs aparecen con el mismo tiempo de migración (Figura 1, partes B y C, picos 4 y 6 respectivamente), mientras que el pico de la α-LA bovina aparece a un tiempo de migración diferente (Figura 1, parte A). Desafortunadamente, en quesos curados de cabra y oveja , la α-LA bovina solapa con un pequeño pico próximo a los correspondientes picos de las α-LAs caprina y ovina. Este solapamiento se puede observar en la Figura 1, parte D, que corresponde a un extracto de oveja al que se han adicionado 200 mg/l de α-LA bovina. Los picos pequeños, adyacentes a los picos de α-LA, suelen ser debidos a productos de degradación de las caseínas durante la maduración del queso [14]. Estos picos no se observaron en quesos frescos, lo que está de acuerdo con esta interpretación. Por otra parte, los picos de las ß-LGs aparecen a tiempos similares para todas las muestras.

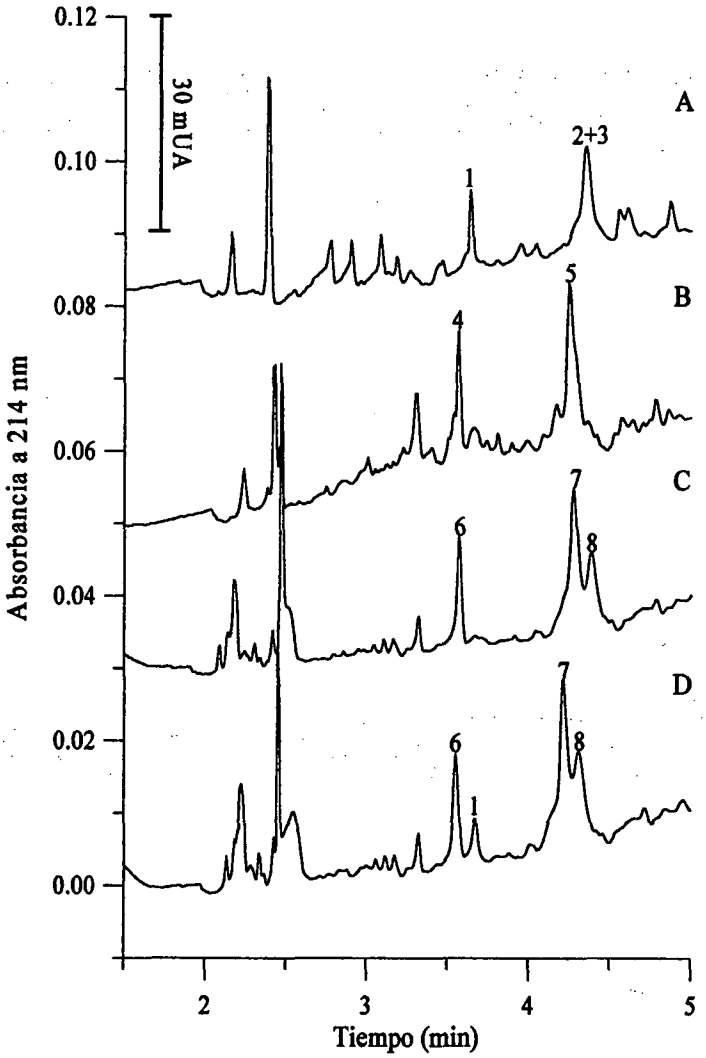


Figura 1. Electroferogramas de suero de quesos curados de vaca (A), cabra (B) y oveja (C). El electroferograma (D) es un extracto de queso de oveja aditivado con 200 mg/l de α-LA bovina. Capilar: 33.5 cm (longitud efectiva 25 cm) × 50 μm I.D.; inyección hidrodinámica: 50 mbar × 3 s; BGE: IDA 50 mM, urea 6 M y HEC 0.5%; campo eléctrico: 700 V/cm (corriente resultante 27 μA); detección a 214 nm. Identificación de picos:1, α-LA bovina; 2, β-LG A bovina; 3, β-LG B bovina; 4, α-LA caprina ; 5, β-LG caprina; 6, α-LA ovina; 7, β-LG A ovina; 8, β-LG B ovina.

Por tanto, no existe un pico adecuado en estos electroferogramas para evaluar la composición de quesos binarios cabra-oveja. Además, la determinación de contenidos bajos de leche de vaca en quesos curados de oveja, resulta interferida por el solapamiento del pico de la α-LA bovina con un pico pequeño, pero no despreciable, debido a la degradación de las caseínas, presente en los quesos curados que contienen leche de cabra y oveja.

Xu y col. [46] encontraron que el Tween 20 y otros tensioactivos no iónicos tienen un efecto discriminante sobre el comportamiento de retención de las α-LAs y ß-LGs bovinas, lo que es debido a la diferente intensidad de asociación de los complejos tensioactivo-proteína. Por ello, se añadió un 0.1% de Tween 20 al BGE. Además, se redujo el campo eléctrico a 300 V/cm. Como se muestra en la Figura 2, en presencia del tensioactivo las líneas base fueron más sencillas, las eficacias aumentaron, y se produjeron pequeños desplazamientos diferenciales en los picos de las α-LAs bovina, caprina y ovina. Los picos de las tres α-LAs aparecieron a tiempos de migración diferentes, lo que hizo posible la determinación de mezclas de quesos binarias y ternarias.

Más aún, como se muestra en la Figura 2, parte D, el pico de la α-LA bovina (adicionado a una muestra de oveja) apareció en los electroferogramas de los quesos de oveja en una región con una línea base plana, bien resuelto del pequeño pico que aparecía en los quesos curados de oveja a un tiempo de migración ligeramente superior al del pico de la α-LA ovina. Análogamente, el pico de la α-LA bovina apareció a un tiempo de migración situado entre el pico de la α-LA caprina (número 4 en la Figura 2) y el pico pequeño de degradación de caseínas, observado en quesos curados de cabra a tiempos ligeramente superiores (Figura 2, parte B), estando bien resuelto tanto del primero como del último (resultados no mostrados).

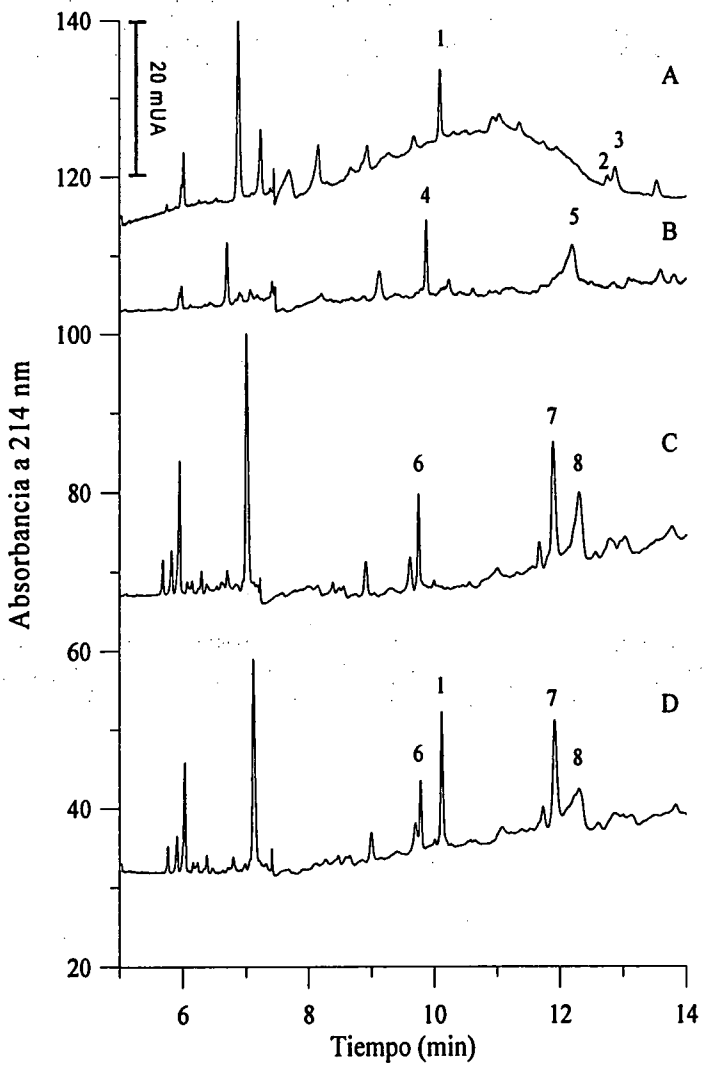


Figura 2. Electroferogramas de suero de quesos curados de vaca (A), cabra (B) y oveja (C). El electroferograma (D) es un extracto de oveja aditivado con α-LA bovina 200 mg/l. BGE: Como en la Figura 1, pero con Tween 20 al 0.1% [BGE (i)]; campo eléctrico: 300 V/cm (corriente resultante 11 μA). Identificación de picos y otras condiciones de trabajo son las indicadas en la Figura 1.

Los experimentos también se llevaron a cabo aplicando un voltaje de 500 V/cm, pero la mejor resolución se obtuvo aplicando un campo eléctrico de 300 V/cm. Con este campo eléctrico, y empleando el BGE (i) recomendado se inyectaron muestras de queso elaboradas con mezclas de cabra-vaca y oveja-vaca, y con una mezcla de los tres tipos de leche. Como se muestra en la Figura 3, se consiguió una excelente separación de las tres α-LAs (los picos 6, 4 y 1 representan las α-LAs de oveja, cabra y vaca, respectivamente). El pico localizado entre los picos 4 y 1 aparecía sólo en quesos curados, y en el electroferograma mostrado en la Figura 3 este pico fue especialmente grande, por lo que se atribuyó a un producto de degradación. Para medir las áreas de los picos, se trazó la línea base interpolando entre las líneas bases de ambos lados del pico considerado.

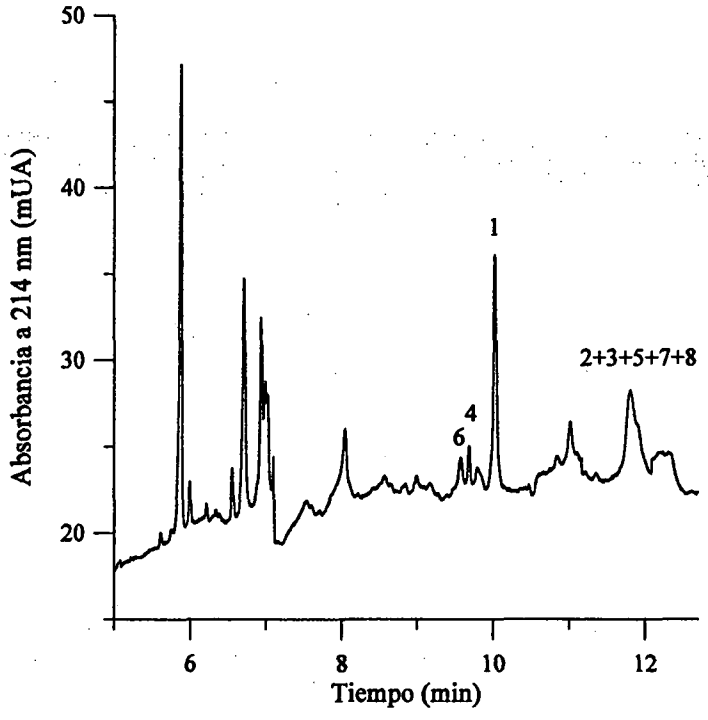


Figura 3. Electroferograma de suero de un queso ternario (Tabla 1, Entrepinares, curado) con la siguiente composición: V, 70%; C, 15%; O, 15%. Las condiciones de trabajo son las indicadas en Figura 2, y la identificación de picos es la indicada en la Figura 1.

3.2. Separación de ß-LGs de diferente origen animal

Se estudió la posibilidad de utilizar no sólo las α-LAs, sino también las ß-LGs, para desarrollar procedimientos mejorados para la determinación de la composición en quesos binarios y ternarios. Se modificó la composición del BGE para conseguir una mejor resolución entre las ß-LGs de diferente origen animal. En primer lugar, se estudió la influencia de la concentración de urea en el intervalo 6-9 M. Conforme se incrementa la concentración de urea se observa un aumento del pH del BGE (hasta pH = 3.3 con urea 9 M). Por otro lado, la resolución mejora hasta una concentración de urea 8 M, y permanece inalterada para concentraciones mayores de urea.

La resolución entre las ß-LGs también mejoró adicionando cantidades crecientes de Tween 20 hasta un 15%, pero a cambio, la sensibilidad disminuyó en más de un 10%. Como se indica en la Figura 4, con un 10% de Tween 20, los picos de las tres ß-LGs aparecen a diferentes tiempos de migración, lo cual hace posible la determinación de mezclas. No obstante, se aprecia una progresiva pérdida de resolución entre las α-LA caprina y ovina a medida que aumenta la concentración de Tween 20. Este inconveniente, confirma que la optimización de la separación de las α-LAs y ß-LGs de diferente origen animal como dos procedimientos independientes, es una opción mejor que intentar optimizar conjuntamente la separación de los picos de las α-LAs y ß-LGs. La elevada concentración de Tween 20 también conduce a un indeseable incremento en los tiempos de migración de las β-LGs. Para paliar este efecto, reduciendo el tiempo de análisis, se decidió incrementar el campo eléctrico. Por ello, se seleccionó un BGE constituido por urea 8 M y Tween 20 al 10%, y se aplicó un campo eléctrico de 450 V/cm.

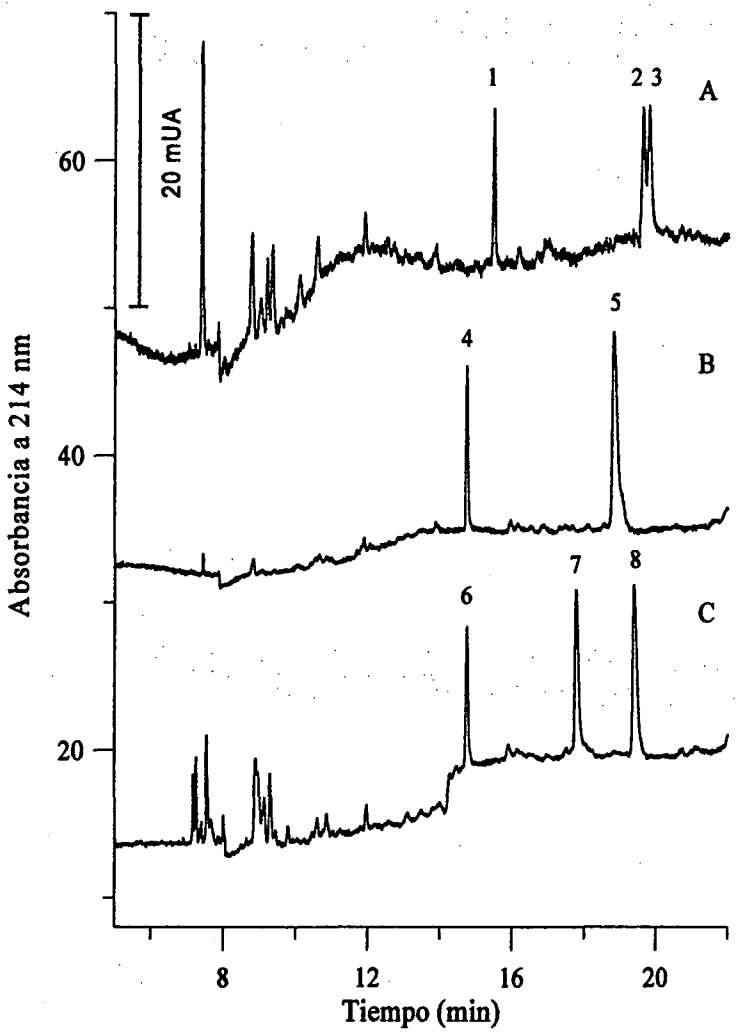


Figura 4. Electroferogramas de suero de quesos curados de vaca (A), cabra (B) y oveja (C). BGE: IDA 50 mM, urea 8 M, HEC al 0.5% y Tween 20 al 10% [BGE (ii)]; campo eléctrico: 450 V/cm (corriente resultante 10 µA); detección a 214 nm. Identificación de picos y otras condiciones son las indicadas en la Figura 1.

En la Figura 5 se muestra el electroferograma de una mezcla ternaria obtenido en estas condiciones. Como se observa, los picos de las ß-LGs de diferente origen animal, incluyendo las variedades genéticas A y B para las proteínas bovina y ovina, se resuelven satisfactoriamente (picos 8, 7, 5, 2 y 3 en la ventana de elución entre los 17 y 20 min). La separación de estos picos se confirmó mediante adición de los extractos con los correspondientes estándares.

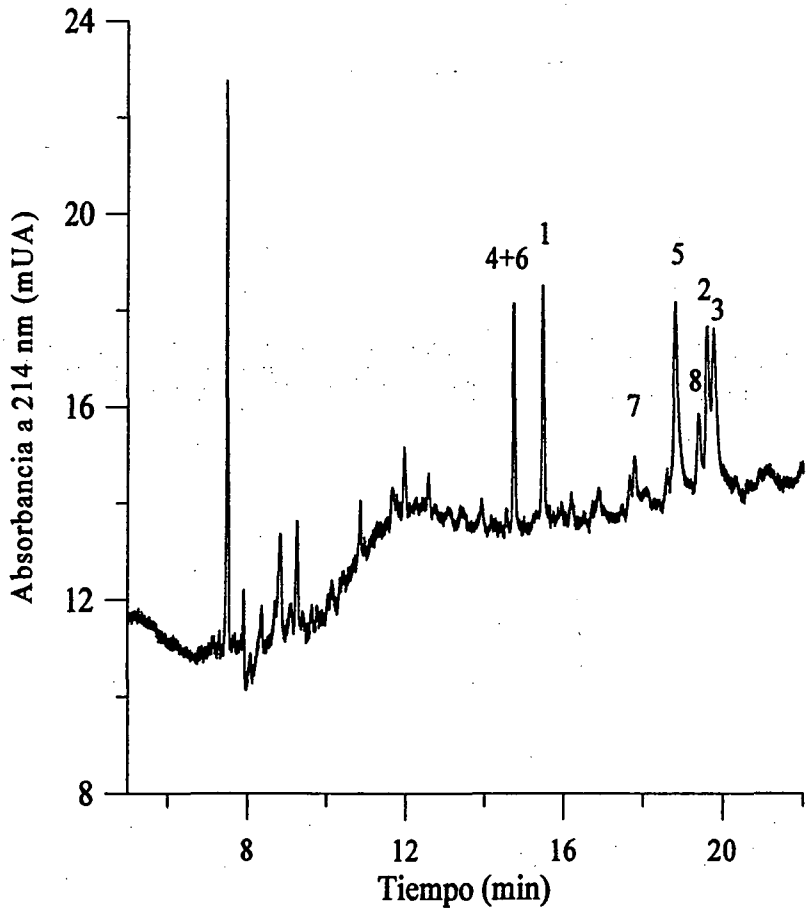


Figura 5. Electroferograma de suero de un queso ternario. BGE y otras condiciones de trabajo son las indicadas en la Figura 4.

3.3. Estudios de cuantificación

Tradicionalmente, para determinar el porcentaje de leche de vaca en productos lácteos se ha empleado la relación entre el área (o altura) de la α-LA o ß-LG bovina respecto el área (o altura) de la ß-LG ovina o caprina [12-15, 37, 38]. Sin embargo, estos cocientes dan lugar a curvas de calibración no lineales, con un incremento en las pendientes a medida que aumenta el porcentaje de leche de vaca, y con elevados límites de confianza cuando el contenido de leche de vaca es alto y los cocientes de áreas de picos tienden asintóticamente a infinito. Las curvas son lineales aproximadamente hasta un 20% de leche de vaca, pero la pendiente se incrementa progresivamente, siendo muy grande por encima de un 60%. En este trabajo, con el fin de superar estos problemas, se propone un enfoque diferente. En primer lugar, se prepararon las mezclas binarias de quesos utilizadas como estándares para establecer los coeficientes de sensibilidad bovina/caprina y bovina/ovina. Estos coeficientes se definieron respectivamente como:

$$\frac{A_v}{A_c} = f^{\alpha}_{v,c}\frac{V}{C} \qquad (1)$$

$$\frac{A_v}{A_o} = f^{\alpha}_{v,o}\frac{V}{O} \qquad (2)$$

donde A_v, A_c y A_o son las áreas de los picos de las α-LA bovina, caprina y ovina, respectivamente; V, C y O son los porcentajes de leche de vaca, cabra y oveja en quesos binarios; y $f^{\alpha}_{v,c}$ y $f^{\alpha}_{v,o}$ son los coeficientes de sensibilidad vaca/cabra y vaca/oveja, respectivamente. Para determinar el coeficiente de sensibilidad para los picos α-LA y β-LG, se prepararon dos series de mezclas binarias, conteniendo entre el 0 y el 70% de queso de vaca en queso de cabra u oveja, y se analizaron utilizando los dos BGEs recomendados. Cada serie contenía siete mezclas binarias de quesos frescos, y siete mezclas binarias de quesos curados. Como se muestra en las Figuras 6 y 7, se obtuvieron líneas rectas para las representaciones de los cocientes A_v/A_c frente a V/C y A_v/A_o frente a V/O, lo que indica que $f^{\alpha}_{v,c}$ y $f^{\alpha}_{v,o}$ son independientes del contenido en leche de vaca.

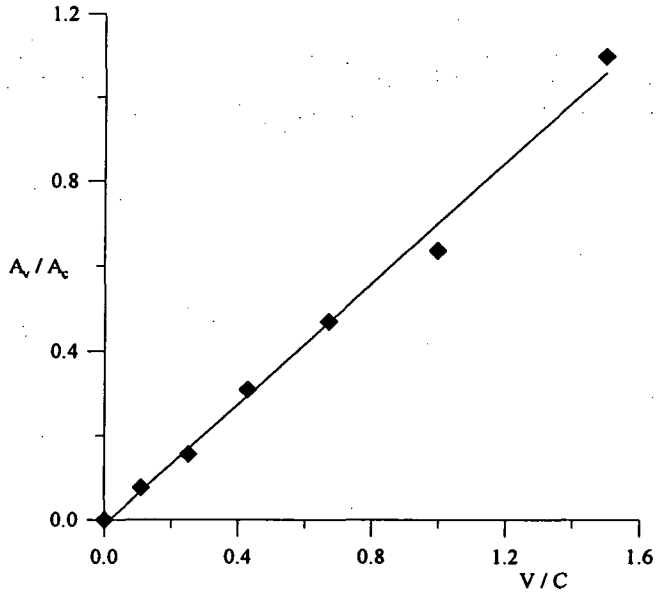


Figura 6. Cociente A_v / A_c frente a V/C para los picos α-LAs, para una serie de mezclas binarias de quesos curados vaca/cabra.

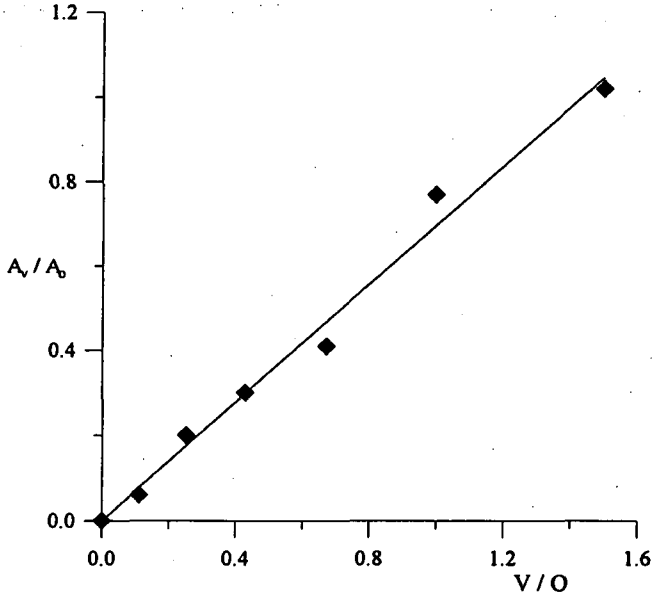


Figura 7. Cociente A_v / A_o frente a V/O para los picos α-LAs, para una serie de mezclas binarias de quesos curados vaca/oveja.

También se obtuvieron comportamientos lineales para los coeficientes de sensibilidad $f^{\beta}_{v,c}$ y $f^{\beta}_{v,o}$, los cuales se definieron mediante expresiones análogas a las ecuaciones (1) y (2), pero utilizando los correspondientes picos de las ß-LGs. Para las ß-LGs bovina y ovina, se utilizó la suma de las áreas de los picos 2 y 3, y 7 y 8, respectivamente. En todos los casos, y dentro del error experimental, los puntos obtenidos, tanto con quesos frescos como con quesos curados, dieron lugar a líneas rectas coincidentes. Los valores experimentales de los coeficientes de sensibilidad obtenidos fueron $f^{\alpha}_{v,c} = 0.71$, $f^{\alpha}_{v,o} = 0.71$, $f^{\beta}_{v,c} = 1.09$ y $f^{\beta}_{v,o} = 0.82$. Las diferencias respecto a la unidad pueden ser debidas a las diferentes absortividades molares de las proteínas a 214 nm, o tal vez también, a que los porcentajes de proteínas séricas de diferente origen animal que pueden quedar retenidas por el queso durante la extracción son distintos. Las relaciones lineales obtenidas indican que los cocientes de áreas A_v/A_c, A_v/A_o y A_c/A_o pueden ser utilizados de forma directa para determinar la composición de quesos binarios.

De acuerdo con las ecuaciones (1) y (2), los cocientes V/C y V/O en quesos vaca-cabra y vaca-oveja son iguales a los cocientes entre áreas de picos A_v/A_c y A_v/A_o divididos por $f^{\alpha}_{v,c}$ y $f^{\alpha}_{v,o}$, respectivamente. Más aún, el cociente C/O en quesos binarios cabra-oveja se puede obtener dividiendo el cociente A_c/A_o por $f^{\alpha}_{v,o}/f^{\alpha}_{v,c}$. Lo mismo se puede indicar en relación con los picos de las ß-LG. Para calcular el contenido de vaca, cabra y oveja en quesos binarios y ternarios se pueden utilizar directamente las expresiones siguientes:

$$V = \frac{A_v}{A_v + f^{\alpha}_{v,c}A_c + f^{\alpha}_{v,o}A_o}100\% = F_v\,100\% \qquad (3)$$

$$C = \frac{A_c}{A_v/f^{\alpha}_{v,c} + A_c + (f^{\alpha}_{v,o}/f^{\alpha}_{v,c})A_o}100\% = F_c\,100\% \qquad (4)$$

$$O = \frac{A_o}{A_v / f^{\alpha}_{v,o} + (f^{\alpha}_{v,c} / f^{\alpha}_{v,o}) A_c + A_o} 100\% = F_o 100\% \qquad (5)$$

o las expresiones análogas referidas a las β-LGs.

Las ecuaciones (3), (4) y (5) se pueden demostrar fácilmente sustituyendo ($f^{\alpha}_{v,c}$ A_c), ($f^{\alpha}_{v,o}$ A_o), ($A_v / f^{\alpha}_{v,c}$), [($f^{\alpha}_{v,o} / f^{\alpha}_{v,c}$) A_o], ($A_v / f^{\alpha}_{v,o}$) y [($f^{\alpha}_{v,c} / f^{\alpha}_{v,o}$) A_c] por sus valores obtenidos de las ecuaciones (1) y (2), y reorganizando las expresiones resultantes. Las ecuaciones (3), (4) y (5) eliminan la necesidad de construir más curvas de calibrado que las utilizadas previamente para evaluar los coeficientes de sensibilidad. Las ecuaciones pueden ser utilizadas indistintamente para establecer la composición de quesos binarios y ternarios. Además, se pueden obtener expresiones análogas a las ecuaciones (3), (4) y (5) para los picos de las ß-LG, teniendo en cuenta que para el caso de las proteínas bovina y ovina se debe utilizar la suma de las áreas de los picos 2 y 3, y 7 y 8, respectivamente. Los coeficientes de sensibilidad pueden cambiar ligeramente con el tipo de queso o bien, con el procedimiento de fabricación, o también, si se utiliza leche de la misma especie animal pero no de la misma raza. Por estas razones, las ecuaciones (3), (4) y (5) pueden conducir a pequeños errores sistemáticos cuando se usan coeficientes de sensibilidad tabulados. Cuando sea así, se deberán llevar a cabo experimentos específicos con los estándares de calibración apropiados, para establecer con ello los coeficientes de sensibilidad propios del problema que se esté resolviendo.

Alternativamente, los estándares se pueden usar para representar F_v, F_c y F_o (calculados usando los valores tabulados de los coeficientes de sensibilidad) frente a V, C y O, respectivamente. Como se muestra en la Figura 8, estas representaciones muestran una relación casi lineal, con una curvatura muy pequeña, ordenada en origen cero y pendiente próxima a la unidad. En caso de no linealidad, un ajuste por mínimos cuadrados a la ecuación cuadrática ($F_v = a + b V + c V^2$) proporciona resultados muy precisos. En la Figura 8 se muestran diversas series de experimentos, no observándose desviaciones significativas del comportamiento lineal predicho. Se obtuvo una representación análoga con los picos de las ß-LGs.

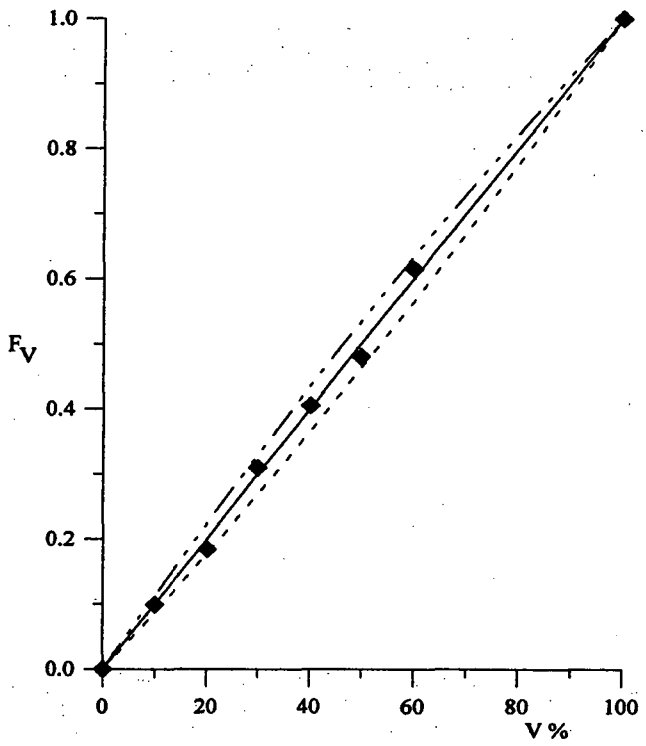


Figura 8. Gráfico de F_v, calculado como se define en la ecuación (3), y usando $f^{\alpha}_{v,c} = f^{\alpha}_{v,o} = 0.71$, frente a V. La línea continua es la pendiente de la recta de regresión, de valor unidad. Las líneas discontinuas se obtuvieron representando F_v calculado usando los valores extremos $f^{\alpha}_{v,c} = f^{\alpha}_{v,o} = 0.60$ (línea superior) y $f^{\alpha}_{v,c} = f^{\alpha}_{v,o} = 0.80$ (línea inferior) para los mismos valores de V.

3.4. Parámetros analíticos significativos

Para establecer los límites de detección se analizaron dos muestras de queso que contenían un 2% de leche de vaca y un 98% de leche de cabra o de oveja, respectivamente, realizándose series de 24 análisis de cada muestra repartidas en tres series de 8 análisis, a razón de una serie por día. Los quesos curados se analizaron utilizando el BGE (i) y 300 V/cm. Se calculó el contenido en leche de vaca usando los coeficientes de sensibilidad y la ecuación (3). Se calculó la media intra-día (como la media de los valores

de los tres días, con 7 × 3 grados de libertad) y las desviaciones estándar intra-día (como la desviación estándar total, con 23 grados de libertad). De acuerdo con la recomendación de la IUPAC [47, 48], los límites de detección se calcularon como 3.29 veces la media de las desviaciones estándar intra-día de los valores de V. Usando este criterio, en el límite de detección los errores α (o tipo I) y ß (o tipo II) son ambos del 5%, y la desviación estándar relativa es del 30%.

El mismo estudio se repitió con las mismas muestras, pero empleando el BGE (ii) y 450 V/cm. En este caso, se usaron las áreas de los picos de las ß-LGs y la expresión equivalente a la ecuación (3). Para obtener los límites de detección de la Tabla 2, se realizaron tres series de ocho determinaciones, y se calculó la media de las tres desviaciones estándar correspondientes, multiplicando finalmente el valor resultante por 3.29. La relación entre la desviación estándar de las áreas de los picos y la desviación estándar de V se puede establecer también teóricamente utilizando la ley de propagación de errores; sin embargo, se debe tener en cuenta que los errores aleatorios de las áreas de los picos usadas como variables de entrada en la ecuación (3) [así como también en las ecuaciones (4) y (5)] están fuertemente correlacionados. La correlación entre los errores de las variables de entrada reduce ampliamente la desviación estándar de V, en comparación con las desviaciones estándar de las áreas de los picos. En otras palabras, la desviación estándar relativa de las áreas de los picos es mayor que la desviación estándar relativa de los cocientes de áreas usados para calcular V.

Debido a la elevada desviación estándar de los picos de las ß-LG, este estudio se repitió con muestras que contenían un 5% de leche de vaca. Los resultados se muestran también en la Tabla 2, y confirman las mejores reproducibilidades y los menores límites de detección obtenidos con los picos de las α-LAs en comparación con los obtenidos con los picos de las ß-LGs. La diferencia se puede atribuir a que la suma de las áreas de dos picos, como ocurre con las ß-LGs bovina y ovina, tiene mayor error que la integración de un sólo pico, como es el caso de las α-LAs. La repetitividad del tiempo de migración presenta una desviación estándar menor del 2% en todos los casos. Las mejores repetitividades, tanto en área como en tiempo de migración, se obtuvieron con quesos frescos.

Tabla 2. Límites de detección [a] y repetitividad en la determinación del contenido de leche de vaca, V, por los procedimientos propuestos.

Picos medidos	Límites de detección, V%	Repetitividad del área de pico (RSD, %)		Repetitividad del tiempo de migración (RSD, %)	
		Intra-día	Inter-día	Intra-día	Inter-día
α-LA[b]	1.1[b]	0.9	1.5	0.4	0.6
β-LG[b]	2.0[b]	1.2	1.8	0.7	0.9
β-LG[c]	2.1[c]	1.2	1.9	0.7	1.0

[a]Como 3.29 veces la desviación estándar, según recomendación de la IUPAC [47].

[b]Usando una muestra con V = 2% y C = 98%, y otra muestra con V = 2% y O = 98%, para estimar la desviación estándar en las proximidades del límite de detección.

[c]Lo mismo que arriba, pero con V = 5%.

3.5. Análisis de muestras

Los procedimientos recomendados se utilizaron para el análisis de las muestras de quesos comerciales indicadas en la Tabla 1. La leche de vaca no debe estar presente en quesos puros de cabra y de oveja, y la adulteración de quesos supuestamente puros o mezclados es económicamente importante tan sólo cuando el contenido en leche de vaca supera en un 10% o más el valor declarado. Como se muestra en la Tabla 1, el método propuesto permite la detección de unas pocas partes por ciento de leche de vaca en quesos puros de cabra y oveja, y de excesos superiores al 10% sobre la composición declarada en quesos binarios y ternarios. Los resultados (columnas 3 y 4), dentro del error experimental, coinciden con la composición declarada por el fabricante y con los datos obtenidos por SDS-PAGE. Sin embargo, se debe hacer notar que los valores obtenidos por integración de los picos de las ß-LGs, sistemáticamente, son entre un 5 y 8% menores que los obtenidos por la integración de los picos de las α-LAs, y también exhiben mayores desviaciones estándar. Como se ha indicado anteriormente, esto último se puede atribuir a un mayor error aleatorio asociado a la cuantificación de la suma de las áreas de dos picos, en comparación con la integración de un único pico. Por otra parte, un error sistemático sólo puede ser producido por factores presentes en las muestras de la Tabla 2, y a la vez ausentes de los estándares usados para obtener los coeficientes de sensibilidad, o para construir las curvas de calibrado. Como se indica anteriormente, los estándares se prepararon mezclando quesos de un único origen animal, mientras que las diferentes leches empleadas en la elaboración de las muestras han sido mezcladas al comienzo del proceso de manufacturado del queso. Por esta razón, la pequeña subestimación del contenido de leche de vaca observada al utilizar los picos de las ß-LGs, puede ser atribuida a la fácil desnaturalización de las ß-LGs bovinas, a diferencias de solubilidad en agua, o a cualquier otra razón desconocida que afecte al proceso de manufacturado del queso.

4. Conclusiones

Se ha desarrollado un procedimiento de electroforesis capilar rápido y simple para la separación y cuantificación de los picos de las α-LAs y ß-LGs de vaca, cabra y oveja en quesos binarios y ternarios. Las variantes genéticas A y B bovina y ovina dan lugar a picos distintos de las correspondientes β-LGs (ver Figuras 4 y 5). En el procedimiento propuesto, la separación tiene lugar en un período de tiempo muy corto, así por ejemplo, la separación de las α-LAs se completa en 11 min, y el tiempo de lavado entre inyecciones sucesivas es de 2 min o menor. Este tiempo es significativamente menor que los 30 min requeridos en los métodos cromatográficos descritos en la bibliografía.

Por otro lado, se ha descrito un enfoque nuevo para realizar el calibrado. Este enfoque es más sencillo y presenta una mejor precisión y exactitud que los procedimientos descritos en la bibliografía. Los procedimientos propuestos presentan menores límites de detección, son más baratos y rápidos que cualquier otro procedimiento de la bibliografía, y pueden aplicarse fácilmente para el control sistemático de la calidad de quesos binarios y ternarios. Una ventaja adicional, nada despreciable, es que los métodos propuestos no requieren capilares recubiertos, como sucede con los métodos que utilizan tampones alcalinos. La utilización de capilares de sílice sin recubrir reduce sustancialmente los costes de los análisis. Debido al bajo pH de trabajo, la supresión efectiva de la ionización de los grupos silanol inhibe la adsorción de proteínas sobre la pared, y además reduce el flujo electroosmótico, mejorando notablemente la reproducibilidad entre inyecciones.

5. Referencias

1. W. Richter, I. Krause, C. Graf, I. Sperrer, C. Schwarzer y H. Klostermeyer, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 204 (1997) 21.
2. M. Beer, I. Krause, M. Stapf, C. Schwarzer y H. Klostermeyer, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 203 (1996) 21.
3. F. Addeo, L. Moio, L. Chianese y A. Di Luccia, Ital. J. Food Sci., 1 (1989) 45.
4. L. Amigo, G. Santa-Maria y D. Gonzalez de Llano, M. Ramos, XXII Int. Dairy Congress, La Haya, 202 (1986) 175.
5. L. Amigo, I. Ibañez, C. Fernandez, G. Santa-Maria y M. Ramos, Milchwissenschaft, 44 (1989) 215.
6. L. Moio, M.L. Sasso, L. Chianese y F. Addeo, Ital. J. Food Sci., 2 (1990) 185.
7. I. Krause, I. Berner y H. Klostermeyer, Electrophoresis Forum (ed. B.J. Radola), Bode, München, 1989, pág. 383.
8. E. Molina, M. Ramos y P. Martin-Alvarez, Z. Lebensm. Unters. Forsch., 201 (1995) 331.
9. M. Ramos y M. Juarez, Intern. Dairy Fed. Bull., 202 (1986) 175.
10. M. De Frutos, A. Cifuentes, L. Amigo, M. Ramos y J.C. Diez-Masa, Z. Lebensm.Unters. Forsch., 195 (1992) 326.
11. W. Urbanke, W. Luf y E. Brandl, Z. Lebensm.Unters. Forsch., 195 (1992) 137.
12. P. Resmini, L. Pellegrino, R. Andreani y F. Prati, Sci. Tec. Latt.-Cas., 40 (1989) 7.
13. L. Pellegrino, I. De Noni, A. Tirelli y P. Resmini, Sci. Tec. Latt.-Cas., 42 (1991) 87.
14. L. Pellegrino, A. Tirelli y F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 43 (1992) 297.
15. I. De Noni, A. Tirelli y F. Masotti, Sci. Tec. Latt.-Cas., 47 (1996) 7.
16. I. Recio, L. Amigo y R. Lopez-Fandiño, J. Chromatogr. B, 697 (1997) 231.
17. J. Otte, K.R. Kristiansen, M. Zakora y K.B. Qvist, Neth. Milk Dairy J., 48 (1994) 81.
18. J. Otte, L. Midtgaard y K.B. Qvist, Milchwissenschaft, 50 (1994) 75.
19. I. Recio, E. Molina, M. Ramos y M. De Frutos, Electrophoresis, 16 (1995) 654.

20. M. De Frutos, E. Molina y L. Amigo, Milchwissenschaft, 51 (1996) 374.
21. I. Recio, M. De Frutos, A. Olano y M. Ramos, J. Agr. Food Chem., 44 (1996) 3955.
22. G.R. Paterson, D.E. Otter y J.P. Hill, J. Dairy Sci., 78 (1995) 2637.
23. G.R. Paterson, J.P. Hill y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 105.
24. N.M. Kinghorn, G.R. Paterson y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 723 (1996) 371.
25. M. Strickland, B.C. Weimer y J.R. Broadbent, J. Chromatogr. A, 731 (1996) 305.
26. I. Recio, M.L. Perez-Rodriguez, M. Ramos y L. Amigo, J. Chromatogr. A, 768 (1997) 47.
27. J.F. Fairise y P. Cayot, J. Agric. Food. Chem., 46 (1998) 2628.
28. N. De Jong, S. Visser y C. Olieman, J. Chromatogr. A, 652 (1993) 207.
29. A. Cifuentes, M. De Frutos y J.C. Diez-Masa, J. Dairy Sci., 76 (1993) 1870.
30. M. Kanning, M. Casella y C. Olieman, LC-GC Int., 6 (1993) 701.
31. J. Van Riel y C. Olieman, Electrophoresis, 16 (1995) 529.
32. N.M. Kinghorn, C.S. Norris, G.R. Paterson y D.E. Otter, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 111.
33. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro, P.M. Toppino y V. Denti, J. Chromatogr. A, 721 (1996) 345.
34. T.M.P. Cattaneo, F. Nigro y G.F. Greppi, Milchwissenschaft, 51 (1996) 616.
35. I. Recio y C. Olieman, Electrophoresis, 17 (1996) 1228.
36. B. Vallejo-Cordoba, J. Cap. Electrophoresis, 4 (1997) 219.
37. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska y M. Masci, Ital. J. Food Sci., 10 (1998) 317.
38. G.P. Cartoni, F. Coccioli, R. Jasionowska y M. Masci, J. Chromatogr. A, 846 (1999) 135.
39. A.V. Stoyanov y P.G. Righetti, J. Chromatogr. A, 790 (1997) 169.
40. P.G. Righetti y F. Nembri, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 203.
41. A. Bossi y P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 2012.
42. C. Gelfi, M. Perego y P.G. Righetti, Electrophoresis, 17 (1996) 1470.
43. A.V. Stoyanov, C. Gelfi y P.G. Righetti, Electrophoresis, 18 (1997) 717.

44. L. Capelli, F. Forlani, F. Perini, N. Guerrieri, P. Cerletti y P.G. Righetti, Electrophoresis, 19 (1998) 311.

45. E. Olivieri, A. Viotti, M. Lauria, E. Simó-Alfonso y P.G. Righetti, Electrophoresis, 20 (1999) 1595.

46. R.J. Xu, C. Vidal-Madjar y B. Sebille, J. Chromatogr. B, 706 (1998) 3.

47. L.A. Currie, Pure Appl. Chem., 67 (1995) 1699.

48. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi y J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997, pág. 426.

ANEXO VI

ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 895 (2000) 227–235

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of cationic surfactants by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with deoxycholate micelles in the presence of large organic solvent concentrations

J.M. Herrero-Martínez, E.F. Simó-Alfonso, C. Mongay-Fernández, G. Ramis-Ramos*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain

Abstract

Mixtures of the cationic surfactants benzalkonium chloride (BKC) and cetylpyridinium chloride (CPC) were quickly resolved and reproducibly and reliably determined by using background electrolytes (BGEs) containing 80 m*M* borate, pH 8.5, bile salts and large concentrations of an organic solvent. When the bile salt is present, the separation mechanism changes from capillary zone electrophoresis (CZE) to a mixed micellar electrokinetic chromatography (MEKC)–CZE, with predominant MEKC interactions, which lead to an excellent resolution of all the solutes, including the C_{12}–C_{18} homologues of BKC and CPC. A BGE containing 50 m*M* sodium deoxycholate and 30% ethanol for an extreme resolution, or 20% tetrahydrofuran for an adequate resolution within a much shorter analysis time, is recommended. The procedure was applied to the determination of the surfactants in industrial and household formulations, with excellent resolution between the homologues, detection limits of a few μg ml^{-1} and reproducibilities below 2%. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Background electrolyte composition; Bile salts; Benzalkonium chloride; Cetylpyridinium chloride

1. Introduction

Cationic surfactants are frequently used as antimicrobial, emulsifying, anticorrosion and softening agents in pharmaceutical preparations, cosmetic formulations, cleaning products, disinfectants and other industrial manufactures [1]. Appropriate analytical procedures for their determination in these products, as well as in urban sewers, industrial effluents and in the environment, are required. Further, some cationic surfactants are industrially produced as mixtures of several homologous compounds, thus, the characterization of samples by resolving the surfactant individual components is of interest in industrial quality control and environmental studies. The determination of cationic surfactants is usually performed by two-phase titration [2,3], high-performance liquid chromatography (HPLC) [4–8], gas chromatography (GC) [9–11] and thin-layer chromatography (TLC) [12–14]. However, owing to the problems associated to strong sorption and peak tailing, resolution is frequently poor, and in many cases homologues cannot be distinguished.

An alternative to chromatography is capillary electrophoresis (CE). The determination and characterization of cationic surfactants by capillary zone

*Corresponding author. Tel.: +34-96-3983-003; fax: +34-96-3864-326.

E-mail address: guillermo.ramis@uv.es (G. Ramis-Ramos).

0021-9673/00/$ – see front matter © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0021-9673(00)00592-6

electrophoresis (CZE) can be conveniently performed by using a background electrolyte (BGE) with a large concentration of an organic solvent which hinders adsorption to the capillary walls, and also prevents the formation of mixed micelles, thus forcing the different chemical species to migrate individually. For this purpose, tetrahydrofuran (THF) [15–17], methanol [18], acetonitrile and acetone [19–21] have been used.

In micellar electrokinetic chromatography (MEKC) uncharged compounds are separated by adding an ionic surfactant at a concentration above its critical micellar concentration (CMC) to the BGE [22,23]. The uncharged solutes are discriminated by the different strength of the solute–micelle interactions. In addition, ionic micelles can also modify the selectivity in the separation of charged solutes via solute–micelle electrostatic and hydrophobic interactions. Thus in MEKC, ionic solutes can be separated by a mixed CZE–MEKC mechanism.

The most widely used surfactant in MEKC has been sodium dodecyl sulfate (SDS) [24,25], but bile salts including sodium cholate (SC), sodium deoxycholate (SDC) and others [26–29], and mixtures of bile salts with SDS [30], or with polyoxyethylene ethers such as polyethylene glycol (PEG) [31,32], are also frequently used. Bile salts having a large, rigid and planar hydrophobic moiety of a steroid nucleus, with two or three hydroxyl groups, are a special group of biosurfactants, whose properties differ considerably from most other surfactants [33]. Bile salts form small helical micelles, with low aggregation numbers, and with the hydrophobic portions of the monomer facing the aqueous solution, while the hydrophilic portions turn inward [34–39]. Bile salts provide different selectivities than SDS, and exhibit several useful chromatographic properties such as the ability to recognize enantiomeric conformations [26,40–42] and increased micelle polarity [27,41]. Further, the micelles formed by bile salts can tolerate large concentrations of organic solvents (e.g., 30% ethanol) without disrupting their structural integrity. This is particularly remarkable, since the micelles of most surfactants are destroyed in water–organic media containing much lower organic solvent concentrations.

In this work, a CE procedure for the separation of the cationic surfactants benzalkonium chloride (BKC) and cetylpyridinium chloride (CPC) was developed. These surfactants are widely used as antimicrobial agents in the treatment of common infections of the mouth and throat, and BKC is also used as a vaginal spermicide and as a disinfectant in working environments, including hospitals. Therefore, rapid and reliable procedures for the determination of these surfactants, including the BKC homologues, in pharmaceuticals and other industrial products is of utmost interest. The surfactants, including the homologues of BKC, were separated by CE in presence of large concentrations of several organic solvents. In addition, SC and SDC were used as selectivity modifiers in the same media, to separate pairs of overlapping peaks, and to improve efficiency, via a mixed CZE–MEKC mechanism. The procedure was applied to the determination of cationic surfactants in industrial and household formulations, with excellent resolution between the homologues.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A HP^{3D} CE system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA), equipped with a diode-array spectrophotometric detector, and a fused-silica capillary (Supelco, Bellefonte, PA, USA) of 33.5 cm (25 cm effective length)×50 μm I.D. (363 mm O.D.) was used. The absorption spectra used for the determination of CMC were measured with two spectrophotometers, i.e., a Lambda-16 (Perkin-Elmer) and an HP8453 diode-array.

2.2. Reagents and samples

The BKC homologues benzyldimethyldodecyl ammonium chloride (C_{12}), benzyldimethyltetradecyl ammonium chloride (C_{14}), benzyldimethylhexadecyl ammonium chloride hydrate (C_{16}) (Fluka, Buchs, Switzerland) and benzyldimethyloctadecyl ammonium chloride (C_{18}) (Aldrich, Milwaukee, WI, USA), and CPC (Sigma, St. Louis, MO, USA), were used as standards. A commercial sample of BKC (containing 62.3% C_{12}, 34.7% C_{14} and 0.4% C_{16}, contents determined by HPLC, Fluka, Quality Con-

trol Department), SC, SDC (Fluka) and SDS (Merck, Darmstadt, Germany), were also used. Optimization studies were performed using 2 m*M* solutions of commercial BKC and CPC in water.

The two buffers used were prepared by adding a diluted sodium hydroxide solution to a sodium dihydrogenphosphate or to a boric acid solution to reach pH 7 or 8.5, respectively; analytical-grade reagents from Panreac (Barcelona, Spain) were used. Methanol, ethanol, acetonitrile, *n*-propanol and THF were from Scharlau (Barcelona). Rhodamine 6G (Sigma) was used for the CMC determinations. All solutions were prepared with deionized water (Barnstead deionizer, Sybron, Boston, MA, USA). Before injection, all solutions were filtered through a 0.45-μm pore size nylon filter (MSI, Westboro, MA, USA).

2.3. Procedures

Daily before use and between runs, the capillary was successively rinsed with 0.1 *M* NaOH (5 min), water (1 min) and the running buffer (5 min). After each working session the capillary was flushed with 0.1 *M* NaOH and water for 10 min each. The hydrodynamic injection mode at 50 mbar, 2 s was used. Unless otherwise indicated, the applied voltage was 15 kV of positive polarity. Detection wavelengths were 214 nm for BKC, and both 214 and 254 nm for CPC. The samples were directly dissolved in water, except some pharmaceutical preparations which were previously diluted with some ethanol. When necessary, peak identification was made by adding standards to the samples. The wavelength shift of the absorption maximum of rhodamine 6G (as the average of the values obtained with the two spectrophotometers) upon increasing the surfactant concentration was used to determine CMC values [28].

3. Results and discussion

3.1. CZE studies

Attempts to separate the homologues of BKC and CPC were initially performed at 25 kV using two BGEs: (i) 80 m*M* borate, pH 8.5, and (ii) 80 m*M* phosphate, pH 7. In both cases, a solution containing CPC and commercial BKC gave a single broad peak with a tail. As expected, the peak was located at a migration time below the electroosmotic flow (EOF) time. The low efficiency and lack of resolution were attributed to the formation of mixed micelles, and tailing to adsorption on the capillary walls. Then, the addition of increasing amounts of either ethanol and *n*-propanol to the BGEs as adsorption competitors and micelle disruptors, was investigated.

Three effects were observed: (i) a reduction of the EOF, as expected from the viscosity increase and adsorption of the alcohol to the capillary walls, (ii) a progressive resolution increase between the peak of the C_{12} homologue of BKC with respect to a single broad peak given by the C_{14} homologue and CPC,

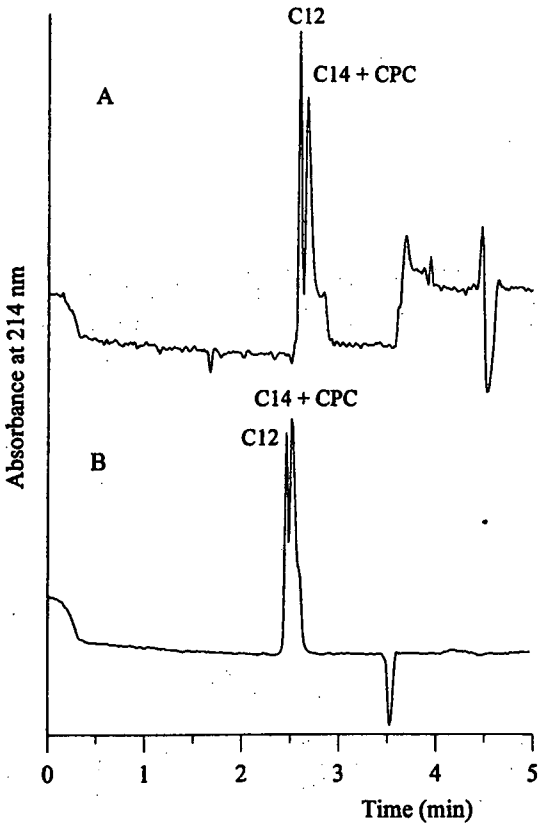


Fig. 1. Electropherograms of a mixture containing 2 m*M* commercial BKC (with 62.3% C_{12} and 34.7% C_{14}) and 2 m*M* CPC. Conditions: 25 kV, positive polarity, BGE containing 80 m*M* phosphate, pH 7.0 and 40% ethanol (A) or *n*-propanol (B). The height of the largest peak corresponds to 15 mAU.

and (iii) an improvement in the efficiency and symmetry of the peaks. The effects can be explained on the basis of the reduction of adsorption and the breakdown of micelles, which allows the migration of the surfactant molecules on individual basis rather than as mixed micelles. As shown in Fig. 1, an incipient separation of the C_{14} and CPC peaks was observed at pH 7 with 40% alcohol. Resolution was better at this pH than at pH 8.5, and tailing was also lower, which can be explained on the basis of the protonation of the silanol groups, and their strong interaction with phosphate.

It should be noted that CPC and the C_{14} homologue of BKC, which have different molecular masses, overlapped, whereas CPC and the C_{12} homologue, which have exactly the same molecular mass, i.e., 304.3 g mol^{-1}, gave a separate peak. The larger migration time of CPC in relation to the C_{12} homologue can be explained as a consequence of the lower electrical density on the CPC aromatic nitrogen, with a charge which is partially neutralized by the π electrons, which does not occur with the alkyl substituted nitrogen of the BKC homologues. This leads to a lower electrophoretic mobility in absolute terms for CPC than for the C_{12} homologue which appears at a longer distance from the EOF time.

Further studies were performed with *n*-propanol at pH 7. Resolution of the C_{12} peak with respect to the peak given by the other two solutes increased up to 40% *n*-propanol, and no further changes other than the progressive reduction of the EOF were observed at higher alcohol concentrations up to 60%. The influence of the buffer concentration was studied using from 20 to 120 m*M* phosphate and 40% *n*-propanol. Maximum resolution was obtained with 80 m*M* phosphate. Similar values of the efficiency and resolution were obtained by decreasing the applied voltage to 15 kV.

3.2. Micellization and MEKC studies using bile salts

To modify selectivity increasing resolution a different approach was tried, i.e., the addition of SC or SDC to the BGE. All micelles are disrupted by large organic solvent concentrations, but the micelles of bile salts can stand much larger solvent concentrations than most other surfactants. Thus, in the presence of adequate concentrations of organic solvents, bile salt micelles can still interact strongly with the free molecules of other surfactants, thus modifying the selectivity of the electrophoretic separations via an additional MEKC retention mechanism. Further, several authors [29,43–45] have recommended the use of basic conditions for the analysis of cationic solutes by CE. However, in basic media cationic surfactants can strongly interact with the extensively ionized silanol groups of the capillary wall. Solute–wall interactions can be avoided by adding a competing base to the buffer [43], e.g., Quang et al. [44] observed a dramatic improvement in peak shapes of organic amines when the concentration of SDS was increased, which was attributed to the effective competition of the anionic micelles with the silanol groups on the capillary wall. Therefore, the presence of SC or SDC in the BGE can also help to improve efficiency and to reduce tailing owing to competition with the solutes for the silanol groups.

When MEKC with anionic micelles and positive polarity are used solute peaks appear after the EOF time and, thus, a basic medium can also be important to reduce analysis time by increasing the EOF.

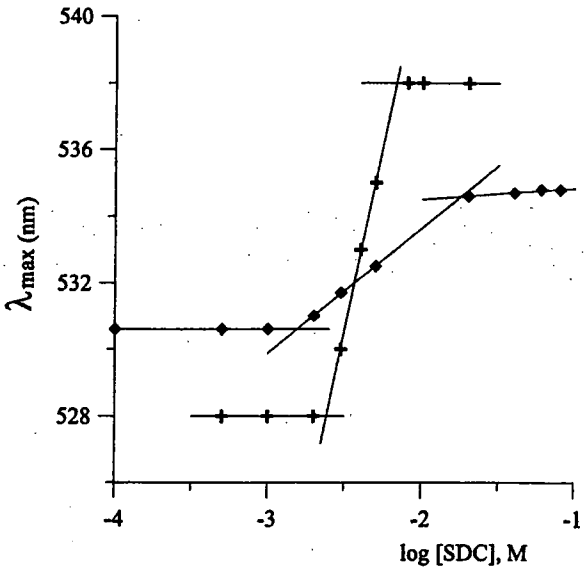


Fig. 2. Wavelength of the absorption maximum of rhodamine 6G plotted against the SDC concentration in a medium containing 80 m*M* borate, pH 8.5 in the absence of ethanol (+) and with 30% ethanol (♦).

Further, the solubility of anionic bile salts such SC and SDC increase in basic media. For these reasons, and to confirm the points discussed above, the CMC of SDC in a series of media containing 80 m*M* borate buffer of pH 8.5, and increasing amounts of ethanol (0, 10, 20, 30, 32, 35 and 40%) was determined. For this purpose, and for each ethanol concentration, a series of solutions with increasing SDC concentrations and containing 2.5 μ*M* rhodamine 6G, was prepared. In all cases, the wavelength of the absorption maximum of the dye, λ_{max}, was measured. For each ethanol concentration, the CMC of SDC was obtained from the inflection point of the corresponding λ_{max} against log [SDC] plot (Fig. 2). As shown in Fig. 3, the CMC decreased slightly when the ethanol concentration increased up to a 32%, and exhibited a sharp increase over this value. Thus, in the 80 m*M* borate buffer of pH 8.5, the SDC micelles stand up to 32% ethanol.

Next, electropherograms of the BKC and CPC mixture were obtained using the same series of 80 m*M* borate buffers, pH 8.5, containing 50 m*M* SDC and increasing amounts of ethanol up to 40%, as BGEs. As can be observed in Fig. 4, in the presence of SDC but without the organic solvent, a single narrow peak located after the EOF time was obtained; however, when the percentage of ethanol increased, the band was resolved in a series of peaks. In contrast to what was observed in the absence of SDC (Section 3.1), all the solutes, including the CPC with respect to the C_{14} homologue of BKC, were resolved over 10% ethanol. The resolution between the C_{14} and CPC peaks was plotted against the ethanol concentration. As observed in Fig. 3, resolution was low at ethanol concentrations below 20%, increased rapidly at higher concentrations and decreased over 35% ethanol, which coincided with the disruption of the SDC micelles.

The influence of the SDC concentration, which

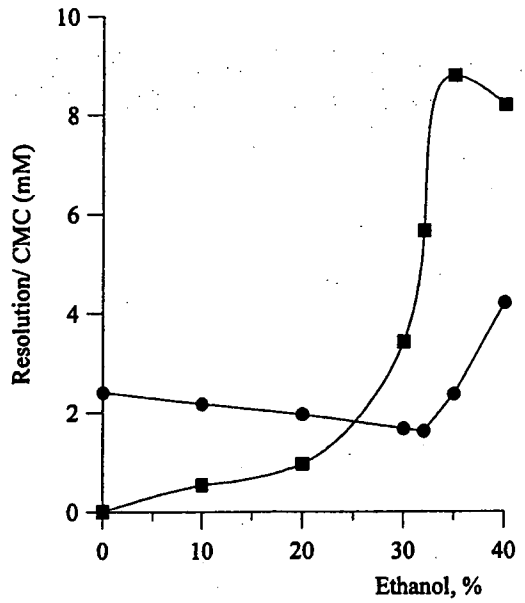


Fig. 3. CMC of SDC (●) and resolution for the C_{14} homologue of BKC and CPC (■) plotted against the ethanol concentration. Conditions: 15 kV, positive polarity, BGE containing 80 m*M* borate, pH 8.5, 50 m*M* SDC and increasing ethanol concentrations.

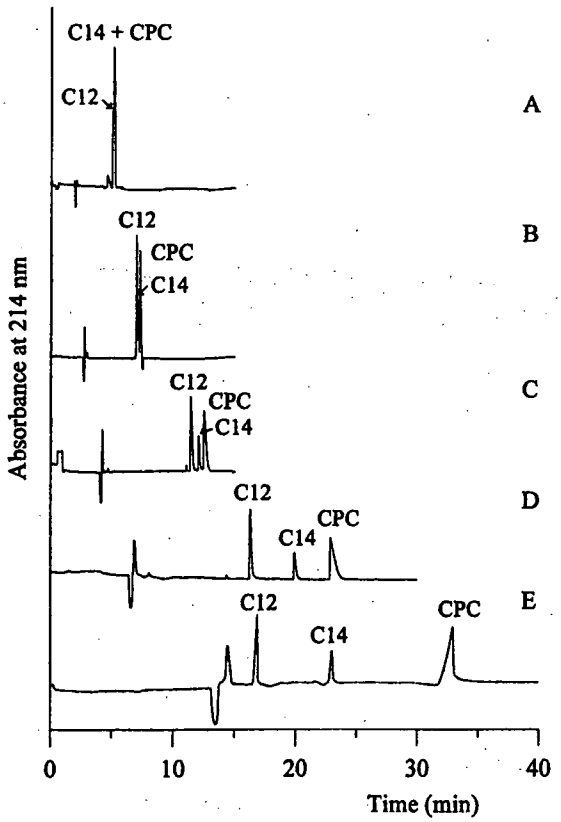


Fig. 4. Electropherograms of a mixture containing 2 m*M* commercial BKC (with 62.3% C_{12} and 34.7% C_{14}) and 2 m*M* CPC. Conditions as in Fig. 3; ethanol concentrations from A–E: 0, 10, 20, 30 and 40%, respectively. The height of the largest peak corresponds to 30 mAU.

was studied with 30% ethanol, is shown in Fig. 5, left part. Resolution and analysis time increased with the bile salt concentration. As also shown in Fig. 5, right part, the same behavior was obtained using SC instead of SDC; however, when compared at the same concentrations, SC gave lower resolution than SDC.

3.3. Comparison with other solvents and use of other additives

BGEs containing 80 m*M* borate, pH 8.5 and 50 m*M* SDC, but substituting ethanol by increasing amounts of methanol, *n*-propanol, acetonitrile or THF were tried. In all cases, and as already observed in Fig. 4 with ethanol, resolution increased up to a maximum when the percentage of organic solvent increased. The optimum found was located ca. 20% for *n*-propanol and THF, 30% for acetonitrile and 40% for methanol.

Excellent resolution was achieved with THF, the analysis time being almost half that when using ethanol (Fig. 6). The peaks were also well resolved in a short time (less than 10 min) with *n*-propanol, but an impurity of CPC appeared too close to the peak of the C_{14} homologue of BKC. Finally, resolution was lower with acetonitrile or methanol. Using these solvents, each one at its respective optimum concentration, resolution and analysis time increased in the order: methanol<acetonitrile<*n*-propanol<THF<ethanol.

The effect of using mixtures of 50 m*M* SDC with other surfactants and PEG, in the presence of 20% *n*-propanol, was tried. Significant modifications of the electropherograms were not observed when the non ionic surfactants Tween 20 or Triton X-100

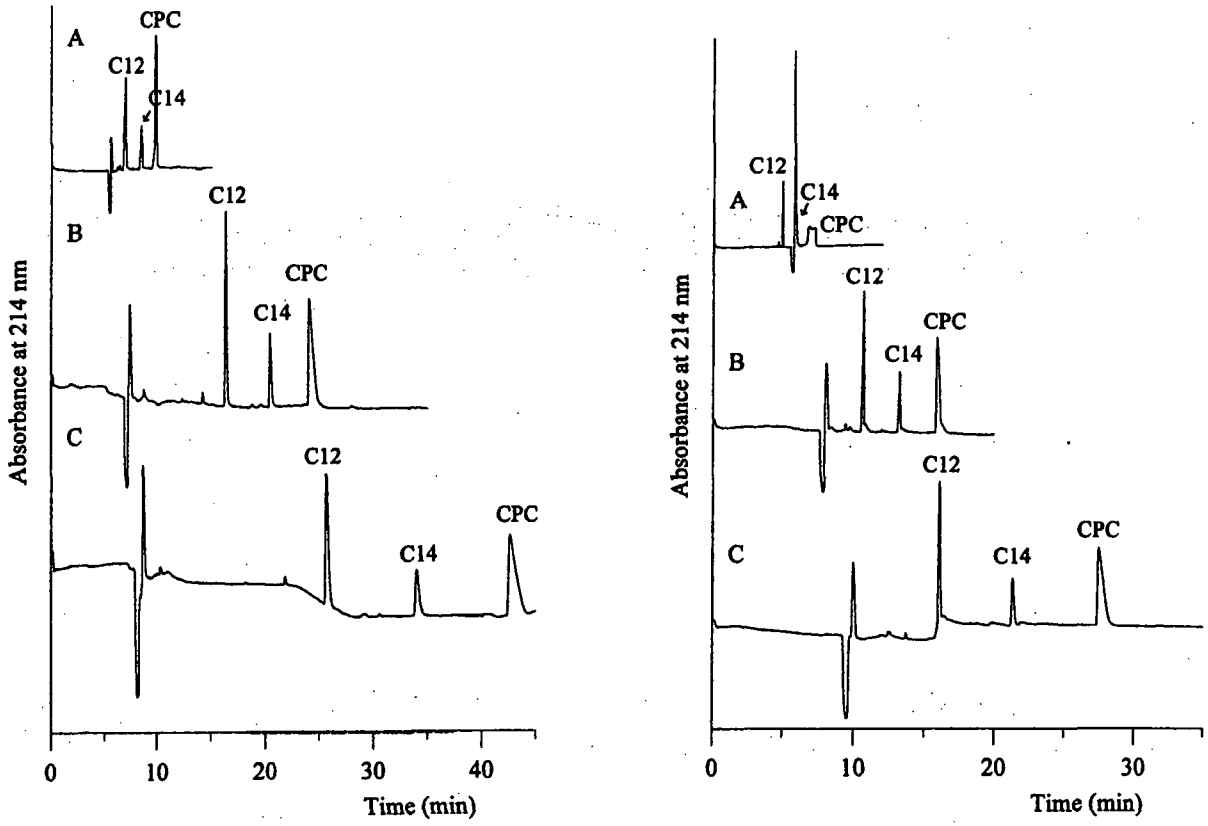


Fig. 5. Electropherograms of the mixture indicated in Fig. 4. Conditions: 15 kV, positive polarity, BGE containing 80 m*M* borate, pH 8.5, 30% ethanol and different bile salt concentrations: 15 (A), 50 (B) and 75 m*M* (C) of SDC (left part) or SC (right part). The height of the largest peak corresponds to 30 mAU.

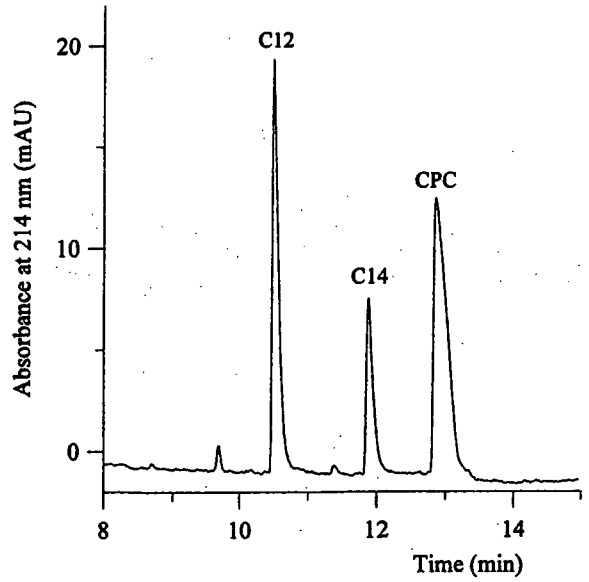


Fig. 6. Electropherogram of the mixture indicated in Fig. 4. Conditions: 15 kV, positive polarity, BGE containing 80 m*M* borate, pH 8.5, 50 m*M* SDC and 20% THF.

(1–10%), or when PEG-4000, PEG-6000 and PEG-10 000 (1, 5 and 10%), were added to the BGE. Resolution and efficiency decreased when SDS (10–40 m*M*) was added.

3.4. Figures of merit

The figures of merit for the determination of the surfactants, including migration time and peak area repeatabilities, relative sensitivities, efficiencies and detection limits at a signal-to-noise ratio of 3, were obtained with 80 m*M* borate, pH 8.5, 50 m*M* SDC and 30% ethanol. Intra- and inter-day repeatabilities were obtained by injecting the same 0.2 m*M* solution three times per day during 3 days. Calibration curves for the C_{12}, C_{14}, C_{16} and C_{18} homologues of BKC (measured at 214 nm), and for CPC (measured at 254 nm) were established by preparing six standard solutions of each solute at evenly spaced concentrations up to 0.6 m*M*. The curves were linear with $r>0.999$; other data are given in Table 1.

Table 1
Migration time (t_m) and peak area (*A*) repeatabilities[a], relative sensitivities (RSs)[b], efficiencies and detection limits for $S/N=3$

Solute	t_m (%)	*A* (%)	RS	$N\cdot10^{-5}$ (m^{-1})	DL ($\mu g\ ml^{-1}$)
C_{12}	0.7; 1.2	1.2; 1.7	1.00	4.9	3
C_{14}	0.8; 1.2	1.4; 1.7	1.01	3.4	4
C_{16}	1.0; 1.4	1.7; 2.1	0.65	2.5	8
C_{18}	1.2; 1.7	2.0; 2.5	0.57	2.05	25
CPC	0.8; 1.4	1.3; 1.9	0.70	2.3	4

[a] As intra- and inter-day relative standard deviations.
[b] As the ratio of the slopes of the calibration curves using concentrations in m*M*. Absorbances were measured at 214 nm for the BKC homologues and at 254 nm for CPC.

Table 2
Analysis of commercial samples

Samples (manufacturer), surfactant analyzed	Declared (%)	Found (%)
Industrial disinfectant for hospitals (Lab. Coloma), BKC	10	9.98
Commercial BKC concentrate (Guinama), BKC	50	49.8
Mini-óvulo, spermicide (Lab. Lanzas), BKC	1.18	1.13
Afta Juventus, mouth disinfectant (Labs. ERN), BKC	0.01	0.0098
Topicaína, oral disinfectant (Organon Teknica), BKC	0.5	0.50
Cuve, skin disinfectant (Labs. Pérez Giménez), CPC	0.1	0.096
Silidermil polvo, skin disinfectant (Fides-Rottapharm), CPC	0.5	0.48
Deli Plus, mouthwash (Faman Cosmetics), CPC	0.025	0.025
Deli Plus with fluoride, mouthwash (Faman Cosmetics), CPC	0.05	0.049

3.5. Application to real samples

The procedure was applied to identify and quantify BKC homologues and CPC in several pharmaceutical preparations, cosmetics, industrial disinfectants and cleaning products. The results are given in Table 2. As shown in Fig. 7 for two samples, well resolved peaks and flat backgrounds were obtained. In all cases, the CPC and BKC concentrations found, this later calculated as the sum of corresponding homologues, corresponded well with the declared composition. For the Guinama sample, whose declared BKC homologues composition was available, we found 67.6% C_{12}, 29.0% C_{14} and 3.4% C_{16}, the declared values being 68% C_{12}, 29% C_{14} and 3% C_{16}.

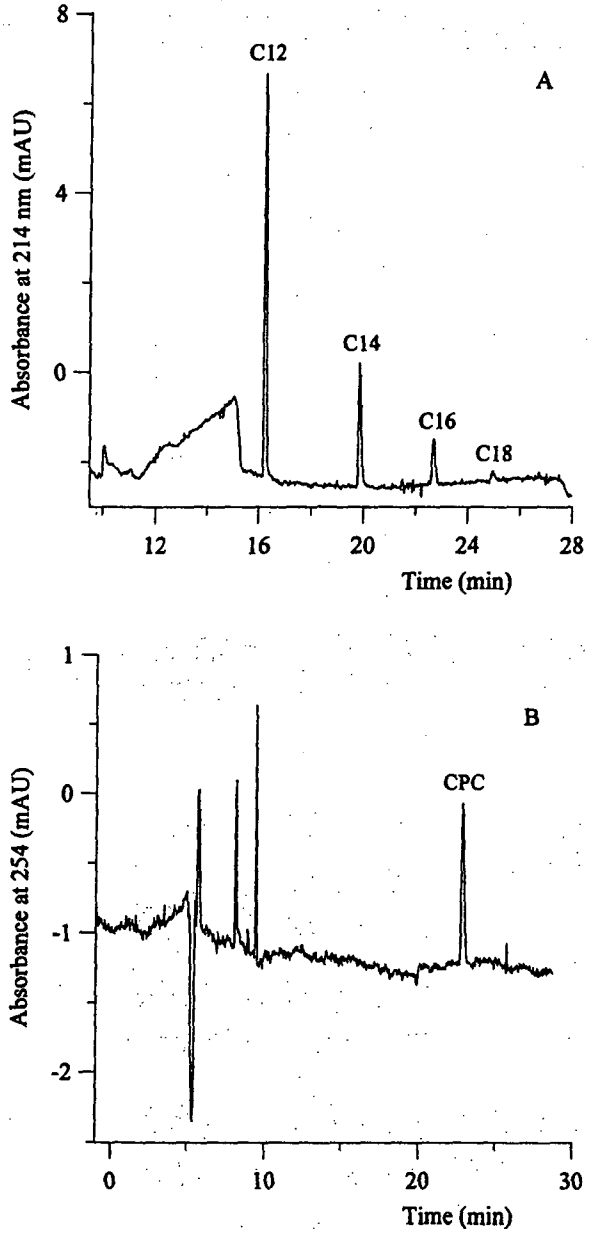


Fig. 7. Electropherograms of an industrial disinfectant for hospitals (A) and a mouthwash (B). Conditions as in Fig. 6, but using 30% ethanol instead of THF.

4. Conclusions

Mixtures of cationic surfactants can be quickly resolved and reproducibly and reliably determined by using BGEs containing a bile salt and large concentrations of an organic solvent. When the bile salt is present, the separation mechanism changes from CZE to a mixed MEKC–CZE, with predominant MEKC interactions. For BKC and CPC mixtures, a BGE containing 80 m*M* borate buffer, pH 8.5, 50 m*M* SDC and 30% ethanol for an extreme resolution, or 20% THF for an adequate resolution with a much shorter analysis time, is recommended. Mixtures of these and other cationic surfactants can also be resolved by using different bile salts at the adequate concentrations. The surfactants and their homologues can be determined with reproducibilities below 2% and detection limits of a few $\mu g\ ml^{-1}$. These limits can be lowered by using extended light path capillaries. The procedure is useful to determine cationic surfactants in a wide scope of industrial and household products.

Acknowledgements

J.M.H.-M. is the beneficiary of a fellowship from the Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana. The authors thank Laboratorios Coloma, S.A. for financial support.

References

[1] J. Cross, E.J. Singer, in: Cationic Surfactants – Analytical and Biological Evaluation, Surfactant Science Series, Vol. 53, Marcel Dekker, New York, 1994, p. 3, Chapter 1.

[2] Surface Active Agents, Detergents, Determination of Cationic-Active Matter, Direct Two-Phase Titration Procedure ISO 2871, ISO, Brussels, 1971.
[3] Surface Active Agents, Detergents, Determination of Anionic-Active Matter, Direct Two-Phase Titration Procedure ISO 2271, ISO, Brussels, 1971.
[4] G. Bleau, M. Desaulniers, J. Chromatogr. 487 (1989) 221.
[5] D.F. Marsh, L.T. Takahashi, J. Pharm. Sci. 72 (1983) 521.
[6] S.L. Abidi, J. Chromatogr. 324 (1985) 209.
[7] S.L. Abidi, J. Chromatogr. 362 (1986) 33.
[8] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, J. Chromatogr. A 745 (1996) 281.
[9] D. Campeau, I. Gruda, Y. Thibeault, F. Legrenge, J. Chromatogr. 405 (1987) 305.
[10] M. Abdel-Rehim, M. Hassan, H. Ehrson, J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 252.
[11] S. Suzuki, Y. Nakamura, M. Kaneko, K. Mori, Y. Watanabe, J. Chromatogr. 463 (1989) 188.
[12] D.W. Armstrong, G.Y. Sline, J. Liq. Chromatogr. 6 (1983) 23.
[13] J. Paesen, I. Quintens, G. Thoithi, E. Roets, G. Reybrouk, J. Hoogmartins, J. Chromatogr. A 677 (1994) 377.
[14] C. Yonese, T. Shihido, K. Maruyama, J. Am. Soc. Oil Chem. Soc. 59 (1982) 112.
[15] C.S. Weiss, J.S. Hazlett, M.H. Datta, M.H. Danzer, J. Chromatogr. 608 (1992) 325.
[16] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, Fresenius J. Anal. Chem. 358 (1997) 500.
[17] E. Piera, P. Erra, M.R. Infante, J. Chromatogr. A 757 (1997) 275.
[18] S.A. Shamsi, N.D. Danielson, Anal. Chem. 67 (1995) 4210.
[19] C.-E. Lin, W.-C. Chiou, W.-C. Lin, J. Chromatogr. A 722 (1996) 345.
[20] C.-E. Lin, W.-C. Chiou, W.-C. Lin, J. Chromatogr. A 723 (1996) 189.
[21] R.B. Taylor, S. Toasaksiri, R.G. Reid, J. Chromatogr. A 798 (1998) 335.
[22] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem. 56 (1984) 111.
[23] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Anal. Chem. 57 (1985) 834.
[24] M.G. Khaledi, J. Chromatogr. A 780 (1997) 3.
[25] P.G. Muijselaar, K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. A 780 (1997) 41.
[26] S. Terabe, M. Shibata, Y. Miyashita, J. Chromatogr. 480 (1980) 403.
[27] H. Nishi, F. Tsukasa, M. Matsuo, S. Terabe, J. Chromatogr. 498 (1990) 313.
[28] R. Cole, M. Sepaniak, W. Hinze, J. Gorse, K. Oldiges, J. Chromatogr. 557 (1991) 113.
[29] A. Citterio, R. Sebastiano, D. Lucchini, presented at the 11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques, Venice, 4–7 October 1998.
[30] J.G. Bumgarner, M.G. Khaledi, Electrophoresis 15 (1994) 1260.
[31] J.G. Clothier Jr., L. Daley, S.A. Tomellini, J. Chromatogr. A 683 (1996) 37.
[32] J.G. Clothier Jr., S.A. Tomellini, J. Chromatogr. A 723 (1996) 179.
[33] D.M. Small, in: The Bile Acids – Chemistry, Physiology, and Metabolism,, Plenum Press, New York, 1971, pp. 249–356, Chapter 8.
[34] D.M. Small, Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser. 84 (1968) 31.
[35] D.M. Small, S.A. Penkett, D. Chapman, Biochim. Biophys. Acta 176 (1969) 178.
[36] G. Conte, R. Di Blasi, E. Giglio, A. Paretta, N.V. Pavel, J. Phys. Chem. 88 (1984) 5720.
[37] G. Esposito, E. Giglio, A. Paretta, A. Zanobi, J. Phys. Chem. 91 (1987) 356.
[38] A.R. Campanelli, E. De Sanctis, E. Chiessi, M. D'Alagni, E. Giglio, L. Scaramuza, J. Phys. Chem. 93 (1989) 1536.
[39] A. Coello, F. Meijide, E. Rodríguez-Nuñez, J. Vázquez-Tato, J. Pharm. Sci. 85 (1996) 9.
[40] H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, S. Terabe, J. Chromatogr. 515 (1990) 233.
[41] R. Cole, M. Sepaniak, W. Hinze, J. High Resolut. Chromatogr. 13 (1990) 579.
[42] S. Terabe, H. Nishi, T. Fukuyama, M. Matsuo, J. Microcol. Sep. 1 (1989) 234.
[43] J.K. Strasters, M.G. Khaledi, Anal. Chem. 63 (1991) 2503.
[44] C. Quang, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, Anal. Chem. 66 (1994) 1646.
[45] J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.Y. Martín, J.C. Diez-Masa, A. Cifuentes, J. Chromatogr. A 823 (1998) 423.

ANEXO VII

José Manuel Herrero-Martínez
Mar Fernández-Martí
Ernesto Simó-Alfonso
Guillermo Ramis-Ramos

Department of Analytical Chemistry,
Faculty of Chemistry,
University of Valencia,
Burjassot, Spain

Determination of alkylphenol ethoxylates by micellar electrokinetic chromatography with bile salts

Octyl- and nonylphenol ethoxylates OPEs and NPEs) with different numbers of ethoxy units average values: $n = 10$ and $N = 40$ for OPEs, and $n = 10$ for NPEs) were separated by micellar electrokinetic chromatography under positive polarity using an 80 mM borate buffer of pH 8.5 containing sodium deoxycholate SDC) or sodium cholate SC). When sodium dodecyl sulfate SDS) was added to the background electrolyte BGE) in the absence of the bile salt, a single peak at a migration time longer than that of the EOF was obtained. Substituting the SDS by a bile salt, the homologues were resolved. At the same bile salt concentration, resolution between the homologues was higher with SDC than using SC. Optimum resolution between consecutive homologues was obtained with 50 mM SDC. In the presence of low or moderate amounts of acetonitrile or *n*-propanol, the background line improved significantly, whereas resolution may increase or decrease slightly. We propose a procedure for the determination of OPEs and NPEs with optimum resolution between the homologues as well as a modified procedure with improved selectivity for the single-run determination of other absorbing nonionic, cationic, and anionic such as linear alkylbenzene sulfonates) surfactants in industrial and household cleaning products and its application to a variety of samples. The detection limit was *ca.* 28 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of total NPE $n = 10$), and peak area repeatabilities at 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ were 1.7% intraday) and 5.6% interday).

Keywords: Alkylphenol ethoxylates / Micellar electrokinetic chromatography / Bile salts / Sodium deoxycholate

EL 4232

1 Introduction

Alkylphenol polyethoxylates APEs) constitute a class of nonionic surfactants which are important to a number of industrial processes, including pulp and paper, textiles, coatings, agricultural pesticides and herbicides, lubricant oils and fuels, and metals and plastics. For instance, in the plastic industry APEs are used as softeners and stabilizer additives, and as UV filters to prevent yellowing. Industrial applications represent 55% of the total APE market. The remaining market sector is comprised of industrial and institutional cleaning products 30%), household cleaning products 15%) and other uses, such as cosmetics <1%) [1]. Since their introduction in the 1940s, the APEs have become widely disseminated in the aquatic environment. The toxicity and associated environmental impact of APEs is an important and controversial issue.

Two major classes of APEs are produced: octyl- and nonylphenol ethoxylates OPEs and NPEs, respectively), both having a hydrophilic chain containing a variable number of ethoxy units. Biodegradation of APEs is characterized by the formation of biorefractory permanent) metabolites such as de-ethoxylated) alkylphenols APs) and mono- and diethoxylated APs [2, 3]. These compounds are strongly lipophilic, and, therefore, they bioaccumulate in aquatic organisms and adsorb on sediments [4]. For these reasons, they are potentially more toxic than the parent hydrophilic APEs. Lipophilic APE metabolites have been found to affect the endocrine systems of fishes and mammals through weak estrogen-like properties [5–11]. The toxicity of APEs increases with decreasing the ethoxy chain length [8]. Also, trace amounts of APEs can stimulate the growth of breast cancer cells [12–15]. However, other studies indicate a low environmental impact of APEs [1, 16].

Appropriate analytical procedures for the determination of APEs in industrial products, household formulations, urban sewers, industrial effluents and environmental samples, are required. Further, APEs are industrially pro-

Correspondence: Prof. G. Ramis-Ramos, Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Spain
E-mail: guillermo.ramis@uv.es
Fax: +34-96-3864436

Abbreviations: AP, alkylphenol; **APE**, alkylphenol ethoxylate; **BKC**, benzalkonium chloride; **CODEA**, coconut oil diethanolamide; **LAS**, linear alkylbenzene sulfonates; **NPE**, nonylphenol ethoxylate; **OPE**, octylphenol ethoxylate; **SC**, sodium cholate; **SDC**, sodium deoxycholate

© WILEY-VCH Verlag GmbH, 69451 Weinheim, 2001

0173-0835/01/0303-526 $17.50+.50/0

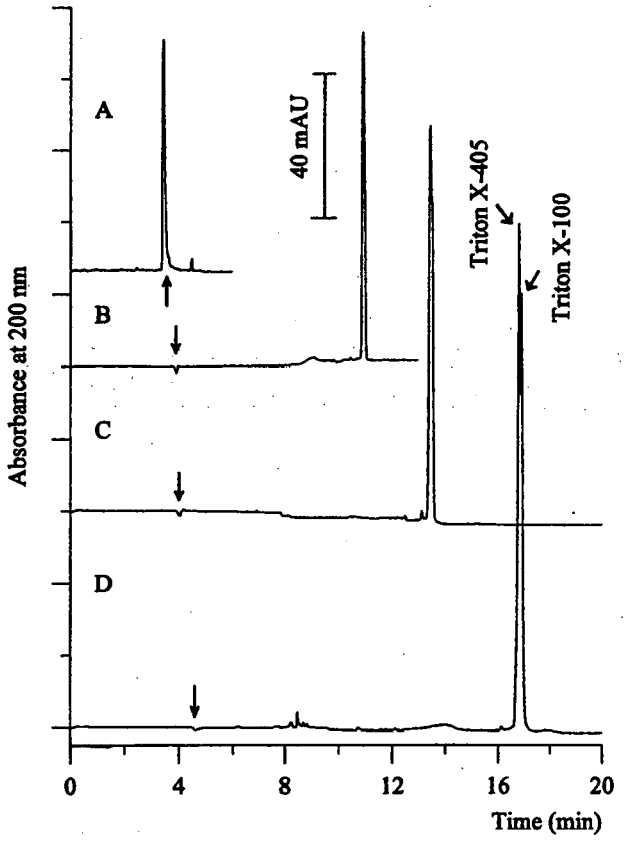


Figure 1. Electropherograms of a mixture of Triton X-100 and Triton X-405, each at a concentration of 500 μg·mL^{-1}, obtained with a BGE containing 80 mM borate buffer at pH 8.5 and increasing SDS concentrations 0, 25, 50, 100 mM). Applied voltage, 15 kV of positive polarity; detection wavelength, 200 nm. The arrows indicate the EOF migration time marked with 1% methanol in the sample).

duced as mixtures of homologues with a broad distribution of the number of ethoxy units. Thus, their characterization in terms of the homologue profile is of interest in industrial and environmental studies. Analytical methods used over many years for the extraction, chromatographic separation, and quantification of APEs and related compounds in environmental samples, including water, effluents, sediments and sludges, have been reviewed [17]. After liquid-liquid, Soxhlet, solid-phase or supercritical fluid extraction of the samples, the APEs can be separated by normal and reversed-phase liquid chromatography LC) [17–23], and by capillary column gas chromatography GC), with a variety of common LC and GC detectors, as well as by various mass spectrometric detection techniques [17, 19–21, 24].

An alternative to chromatography is capillary electrophoresis. The APEs have been resolved in their homologue species and determined by capillary gel electro-

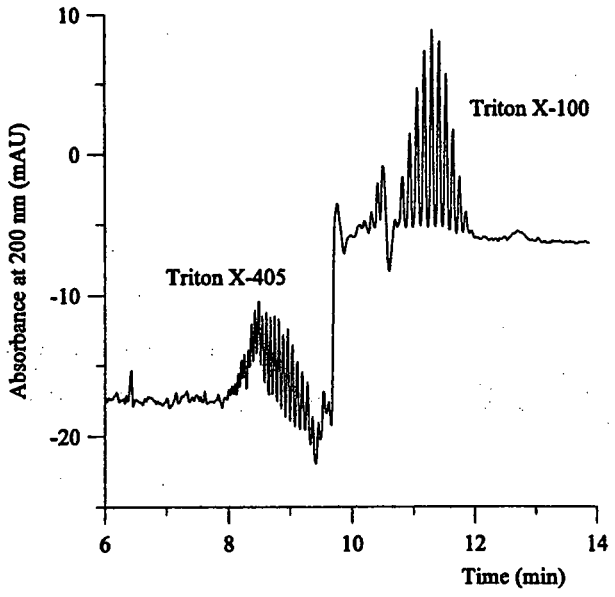


Figure 2. Electropherogram of a mixture of Triton X-100 and Triton X-405 500 μg·mL^{-1} each) obtained with a BGE containing 80 mM borate at pH 8.5 and 50 mM SDC. The EOF migration time was 4.5 min.

phoresis with previous derivatization with phthalic anhydride in order to provide the solutes with charge [25]. However, separation of the underivatized APEs is possible using micellar electrokinetic chromatography MEKC), a mode of capillary electrophoresis that is capable of separating uncharged compounds [26, 27]. In MEKC, an ionic surfactant, which associates with the analytes, is added to the background electrolyte BGE). The uncharged solutes are discriminated by the different stability of the solute-micelle association complexes. The determination and characterization of APEs by MEKC using a BGE containing sodium dodecyl sulfate SDS) has been demonstrated [22, 23, 28–30]. In the absence of an organic solvent, the APEs are strongly associated to the SDS micelles, and a single peak, at a migration time much longer than the electroosmotic flow EOF) migration time, is obtained. This peak can be used to determine the total amount of APEs, although other absorbing hydrophobic solutes can interfere [23, 29]. In the presence of a large concentration of an organic solvent *e.g.*, 35–40% acetonitrile), the SDS and APEs micelles are disrupted, and the different homologues are separated by solvophobic association with the isolated SDS ions [22, 23, 28–30].

The most widely used surfactant in MEKC is SDS [31–33], but bile salts [34–36], and mixtures of bile salts with SDS [37], or with polyoxyethylene ethers [38, 39], are also used. Bile salts, having a large, rigid and planar hydrophobic moiety of a steroid nucleus, with two or three hydroxyl groups and a carboxylate, are a special group of

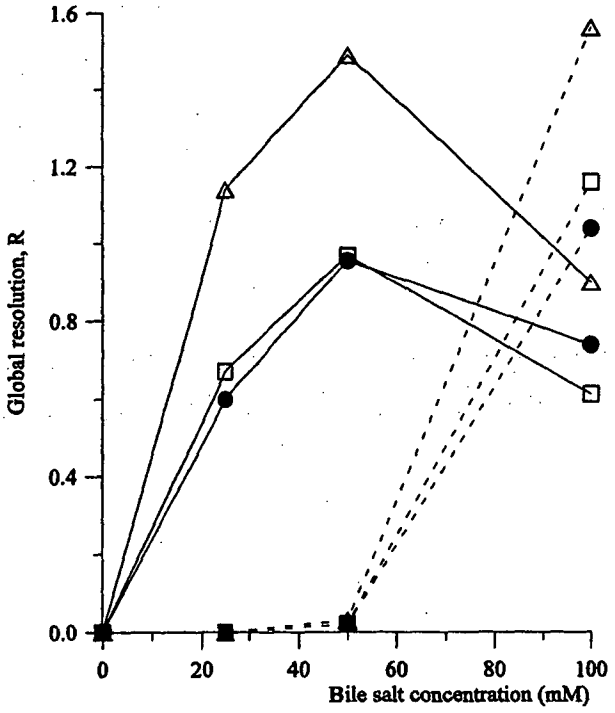


Figure 3. Global resolution, *R*, as the geometric mean of the resolution between the consecutive peaks of the three more abundant homologues, plotted against the bile salt concentration. The BGE contained 80 mM borate at pH 8.5 and increasing concentrations of SC dashed lines) or SDC continuous lines). Test solutions: □) NPE, △) Triton X-100, ●) Triton X-405.

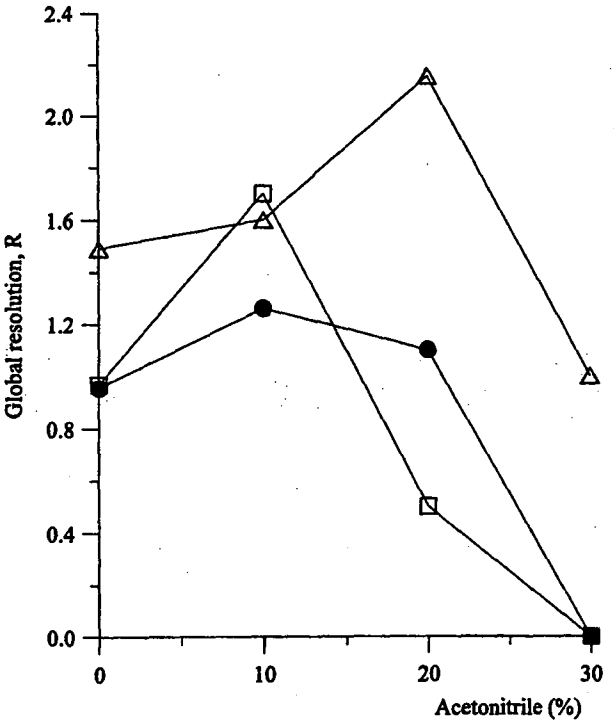


Figure 4. Global resolution, *R*, plotted *vs.* the acetonitrile concentration. The BGE contained 80 mM borate at pH 8.5, 50 mM SDC and the indicated acetonitrile concentrations. Symbols as in Fig. 3.

biosurfactants, whose properties differ considerably from ordinary aliphatic and aromatic surfactants [40]. Bile salts, including sodium cholate SC), sodium deoxycholate SDC) and others, form small helical micelles, with the hydrophobic portions of the monomer facing the aqueous solution, while the hydrophilic portions turn inward [41–46]. Bile salts provide different selectivities than SDS, and exhibit several useful chromatographic properties such as the ability to discriminate enantiomers [47–49] and increased micelle polarity [34, 38].

In a previous work, we used bile salts to separate cationic surfactants in a medium containing SDC micelles and high ethanol or tetrahydrofuran concentrations [50]. In this work, the MEKC separation of APE homologues using bile salts in the absence and presence of organic solvents and SDS is studied. We developed a procedure for the single-run determination of APEs, other absorbing nonionic surfactants as coconut oil diethanolamide, CODEA) and linear alkylbenzenesulfonates LAS), with excellent resolution between the homologues of all the surfactants in industrial and household cleaning products.

2 Materials and methods

2.1 Instrumentation

An HP^{3D} capillary electrophoresis system Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) provided with a diode-array spectrophotometric detector, was used. Fused-silica capillaries Supelco, Bellefonte, PA, USA) of 48.5 cm length 40 cm effective length) × 50 μm ID 363 mm OD) were used. Separations were performed at 15 kV of positive polarity. Detection wavelength was 200 nm. The hydrodynamic injection mode with 50 mbar × 2 s was used. Daily before use, the capillary was successively rinsed with 0.1 M NaOH, water, and the running buffer for 5 min each. Between runs, the capillary was also conditioned with 0.1 M 5 min) and the running buffer 7 min). After each working session, the capillary was flushed with 0.1 M NaOH and water for 10 min each.

2.2 Reagents and samples

NPE with an average of 10 ethoxy groups, and the OPEs Triton X-100 and Triton X-405, with an average of 10 and 40 ethoxy groups, respectively Fluka, Buchs, Switzerland), were used. SC and SDC were from Fluka, and SDS from Merck Darmstadt, Germany). The optimization

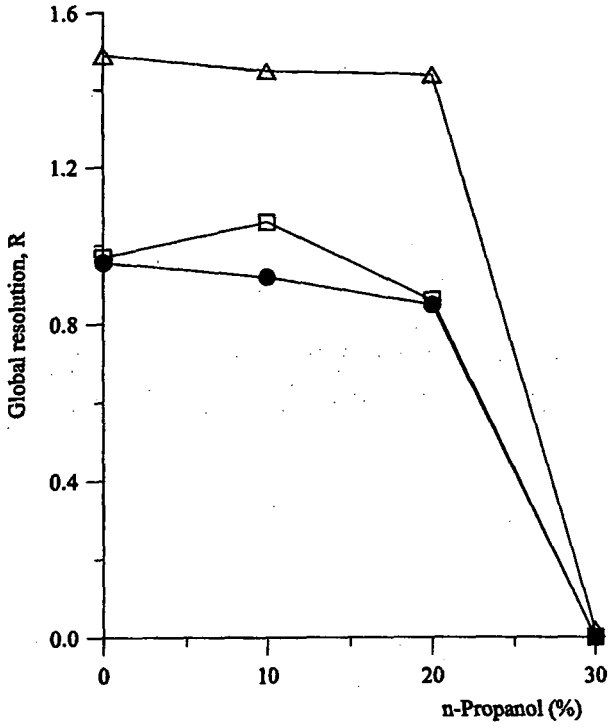


Figure 5. Global resolution, *R*, plotted *vs.* the *n*-propanol concentration. Other conditions and symbols as in Fig. 4.

of the separation conditions was performed in all cases by injecting the following four test solutions: NPE, Triton X-100, Triton X-405, and a mixture of Triton X-100 and X-405. The concentration of the surfactants in the test solutions used in our optimization studies was 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Analytical grade NaOH and boric acid were supplied by Panreac Barcelona, Spain). Acetonitrile and *n*-propanol were from Scharlab Barcelona). All solutions were prepared with deionized water Barnstead deionizer; Sybron, Boston, MA, USA). Before injection, all solutions were filtered through a 0.45 µm nylon filter MSI, Westboro, MA, USA). Surfactants from industrial suppliers, also used as standards in the analysis of industrial and household products, were: CODEA EMPILAN 2502; Albright & Wilson Ibérica, Barcelona, Spain), NPE with $n = 10$ EMPILAN NP 10 from Albright & Wilson Ibérica; DEHYDROPHEN PNP 10 from Pulcra-Henkel Ibérica, Barcelona), LAS containing 8.7% C_{10}, 40.6% C_{11}, 34.7% C_{12}, and 14.3% C_{13}; Petresa, San Roque, Cádiz, Spain) and benzalkonium chloride BKC; containing 62.3% C_{12}, 34.7% C_{14}, and 0.4% C_{16}; Fluka). When necessary, the assignment of the peaks was made by adding these standards to the samples.

2.3 Recommended procedures

The sample 0.2–1 g) was diluted with water or *n*-propanol, if necessary) up to 25 mL, filtered and injected. Rec-

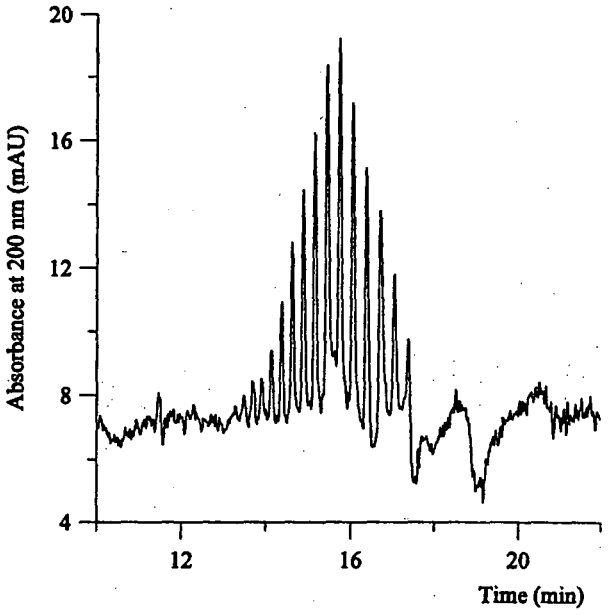


Figure 6. Electropherogram of Triton X-100 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$) obtained with a BGE containing 80 mM borate at pH 8.5, 50 mM SDC and 20% acetonitrile.

ommended are: BGE i) for a maximum homologue resolution of APEs with $10 \leq n \leq 40$, in the absence of other absorbing surfactants, 80 mM borate at pH 8.5 with 50 mM SDS and 10% acetonitrile or *n*-propanol; BGE ii) for an improved selectivity with samples containing APEs and other absorbing surfactants, 80 mM borate at pH 8.5 with 75 mM SDC and 20% acetonitrile or *n*-propanol.

3 Results and discussion

3.1 Optimization studies

3.1.1 MEKC studies with SDS

As shown in Fig. 1A, for all combinations of the standards a single peak at the EOF migration time was obtained by injecting the test solutions in a BGE containing 80 mM borate at pH 8.5 in the absence and presence of increasing concentrations of acetonitrile or *n*-propanol. In the absence of organic solvents, the single peak showed a short tail indicating adsorption. Next, the same buffer in the absence of organic solvent, but with increasing SDS concentrations, was tried. The single peak appeared at migration times which were progressively longer than the EOF migration time Fig. 1B–D). This can be interpreted in terms of strong association of the solutes with the anionic SDS micelles. However, as shown in Fig. 1C and D, an incipient separation between Triton X-100 and Triton X-405 was observed with more than 50 mM SDS. At the same time, the peak showed no tail and efficiency improved, which can also be attributed to association of

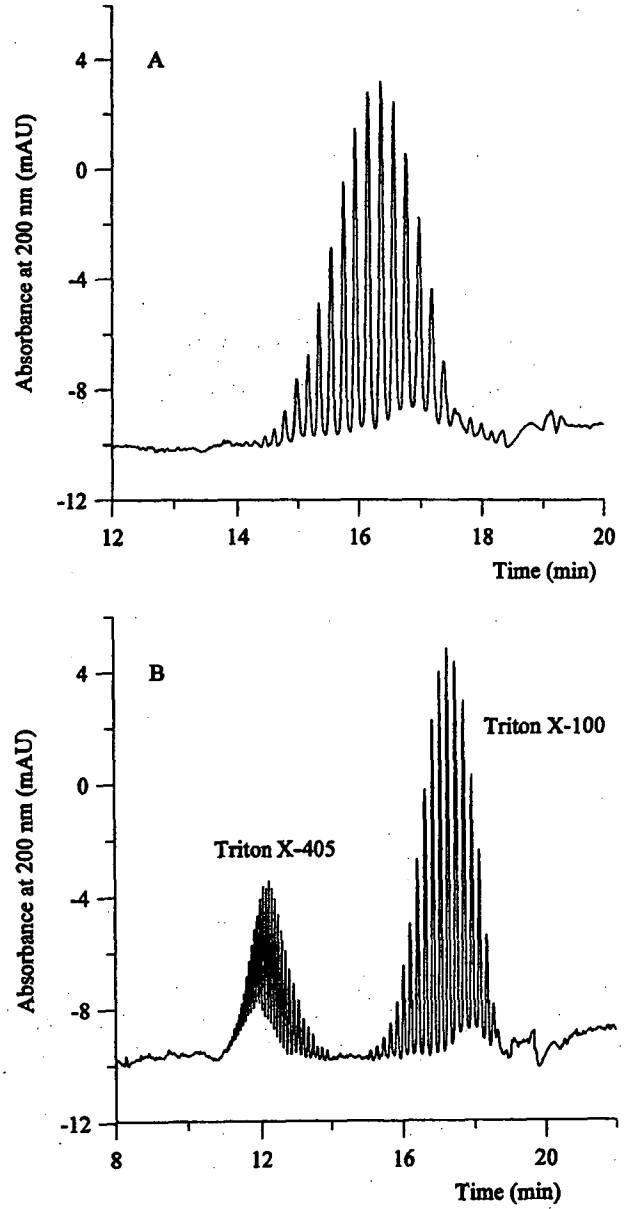


Figure 7. Electropherograms of A) NPE and B) a mixture of Triton X-100 and Triton X-405 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$ of each solute); BGE as in Fig. 6, but without acetonitrile and with 10% *n*-propanol.

the solutes with SDS and to hindering of adsorption owing to the concurrence of SDS for the active sites on the capillary wall. In agreement with literature results [22, 23, 28–30], the homologues of the OPEs and NPE were resolved when 35% acetonitrile was added to the BGE containing 50 mM SDS.

3.1.2 MEKC studies with bile salts

As shown in Fig. 2, resolution of the homologues was also achieved in the absence of SDS and without an organic solvent, by using SDC as pseudostationary phase and

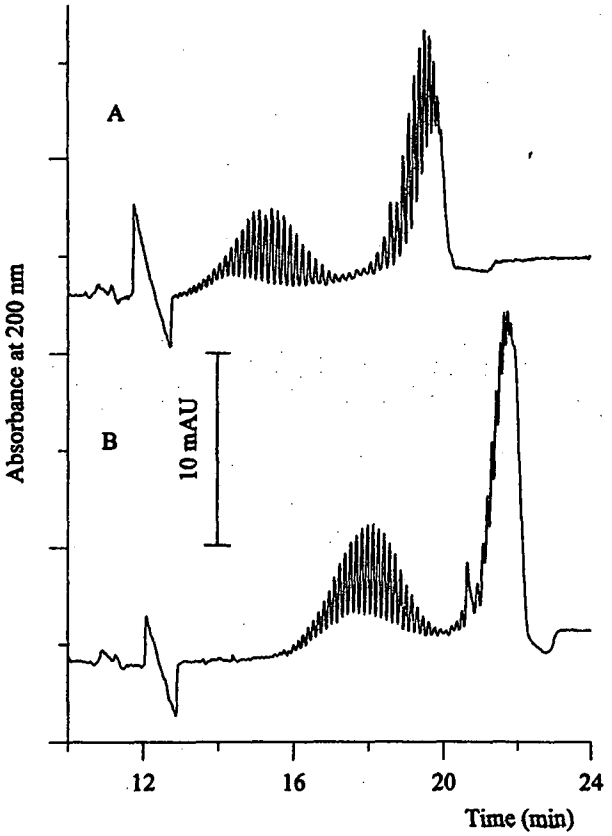


Figure 8. Electropherograms of a mixture of Triton X-100 and Triton X-405 500 $\mu g \cdot mL^{-1}$ each) obtained with a BGE containing 80 mM borate at pH 8.5, 50 mM SDC and the following SDS concentrations: A) 50 and B)75 mM.

discriminating agent. The influence of the SDC concentration, as well as the use of SC, on the homologue resolution was also studied. For this purpose, the global resolution, *R*, was evaluated as the geometric mean of the resolution between the consecutive peaks of the three more abundant homologues of each surfactant. The results given in Fig. 3 showed an optimum resolution with 50 mM SDC. To achieve similar values of the resolution using SC, a much higher concentration was required. This is a general behavior [37, 50] which can be attributed to the higher ability of SDC to associate with hydrophobic solutes in comparison to SC which has an additional hydroxyl group.

As observed in Fig. 2, and as a consequence of the association with the anionic bile salt micelles, the migration times of the solutes were longer than the EOF migration time. The delay can be explained due to differences of both molecular weight and hydrophobicity. A longer delay can be expected for solutes with a lower molecular weight, which should be more easily dragged against the EOF. Consequently, and for solutes having the same

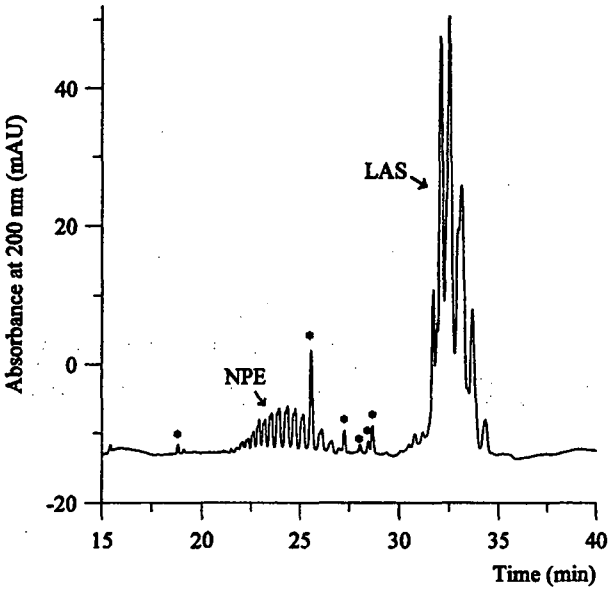


Figure 9. Electropherogram of a domestic wool detergent obtained with BGE ii) showing the peaks of the NPE and LAS homologues, and those of CODEA marked with an asterisk).

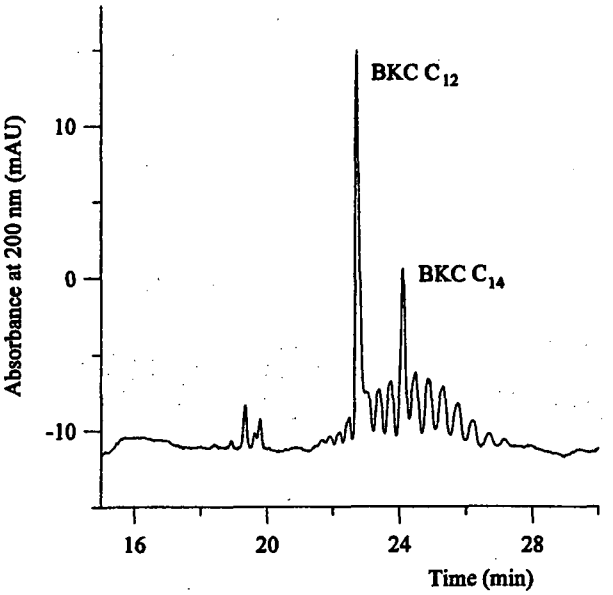


Figure 10. Electropherogram of a disinfectant cleaner obtained with BGE ii) showing the peaks of the BKC homologues with 12 and 14 carbon atoms in the alkyl chain and NPE.

hydrophobic moiety, the homologues with a lower number of ethoxy units should appear at longer migration times. On the other hand, these solutes are more hydrophobic, and should associate more strongly with the bile salt micelles and again appear at longer migration times. This can be observed in Fig. 2, where Triton X-100 (n = 10) showed a longer migration time than Triton X-405 (n = 40). Also, for any particular APE, the peaks at lower migration times should correspond to the homologue with a higher number of ethoxy units.

On the other hand, an increase of the molecular weight of the hydrophobic moiety has two opposite effects on the solute migration time: i) an increase produced by a stronger association with the micelles, and ii) a decrease due to the higher molecular weight. Experimentally, and in all cases, the NPE with n = 10 exhibited slightly longer migration times than the corresponding OPE Triton X-100) about 11.5 min *vs.* 11.8 min for the main peaks). This indicated that, for solutes having different hydrophobic moieties and the same number of ethoxy units, the effect of the higher hydrophobicity slightly predominated over the effect of a larger molecular weight.

It is interesting to observe that homologue resolution can be obtained by the sole action of the bile salt, whereas a large concentration of an organic solvent is required when SDS is used. SDS is the usual approach for capillary zone electrophoresis and MEKC separations of ionic and uncharged surfactants, in which the high organic solvent concentration is necessary to breakdown the micelles, thus allowing the surfactant molecules to migrate on individual basis rather than as mixed micelles. Mixed micelles can be constituted by a variable number of solute or guest molecules of different molecular weight *e.g.*, different homologues), and a variable number of host or surfactant ions. Usually separation is not possible if mixed micelles are formed, owing to the broad scope of guest/host ratios. Thus, the separation of the APE homologues by bile salts in the absence of organic solvents suggests the formation of aggregates constituted by a single surfactant molecule inserted in a small bile salt micelle.

The influence of the addition of an organic solvent to the BGE in the presence of the bile salt was also investigated. The micelles formed by bile salts can tolerate high concentrations of organic solvents *e.g.*, 30%) without disrupting their structural integrity. This is particularly remarkable since the micelles of most ionic and nonionic surfactants are destroyed with relatively low organic solvent concentrations. BGEs containing 80 mM borate at pH 8.5, 50 mM SDC and increasing concentrations of acetonitrile or *n*-propanol were used. As indicated in Fig. 4, resolution improved slightly with all test solutions in the presence of moderate concentrations of acetonitrile, and decreased at higher concentrations. As also shown in Fig. 5, resolution was approximately the same with moderate *n*-propanol concentrations, and decreased with more than 20% *n*-propanol. The analysis time was longer with the alcohol. As observed by comparing Figs. 6 and 7 with Fig. 2, the resulting flat and less noisy background lines were an important advantage of the use of moderate amounts of acetonitrile or *n*-propanol.

In comparison to other electropherograms reported in the literature [22, 28, 30], resolution between the homologues was similar for the APEs with low and medium number of ethoxy groups, but an improved resolution was achieved with Triton X-405, with a large number of ethoxy units (n = 40). In addition, Fig. 7B shows that mixtures of APEs with low Triton X-100, n = 10) and high Triton X-400, n = 40) number of ethoxy groups can be resolved in a single run. The small peaks around 18 min in Fig. 7A corresponded to the NPE homologues with a low number of ethoxy groups and to nonylphenol, and similarly, the OPE homologues with a few number of ethoxy units and octylphenol should appear around 19 min in Fig. 7B. Thus, the procedure can be applied to the identification and evaluation of the highly hydrophobic AP and APEs which is of upmost interest in environmental studies.

The influence of increasing concentrations of SDS added to BGEs containing 50 mM SDC, in the absence and presence of 10% *n*-propanol, was studied. The effects of SDS were: i) to increase migration time, ii) to slightly increase resolution up to an SDS concentration of *ca.* 20 mM, and iii) a resolution decrease for NPE and OPE with n = 10 at SDS concentrations higher than 20 mM. These surfactants are more hydrophobic than Triton X-405 with n = 40), and thus, they associate more strongly with SDS, their homologues progressively melting together in a single peak. This effect is shown in Fig. 8.

3.2 Analysis of industrial samples

The industrial samples indicated in Table 1, containing NPE with n = 10 and other surfactants, were analyzed. With BGE i) using *n*-propanol, and in the absence and presence of 20 mM SDS), the peaks of the other surfactants mainly LAS) overlapped with the NPE peaks, thus hindering accurate evaluation of NPE. Selectivity did not improve by increasing the SDC concentration up to 100 mM. The concentration of *n*-propanol was also increased up to 30% at several SDC concentrations. In the presence of *n*-propanol, the migration time of the LAS peaks increased considerably with respect to the migration time of the NPE peaks. The highest selectivity between the NPE homologues, and simultaneously, the largest distance between the LAS and NPE peaks, was achieved with 75 mM SDC and 20% *n*-propanol. Thus, the experiments explained below were performed using BGE ii).

As shown in Fig. 9, the peaks of NPE and LAS were separated. Further, the LAS isomers and homologues were partially resolved. Also, the main peak of CODEA partially overlapped with the peak of an NPE homologue; however, this did not hinder NPE quantification, since the area of this homologue could be obtained by linear interpolation using the peak areas of the other homologues. The same procedure was used to quantify three of the NPE homologues in a disinfectant cleaner, since they overlapped with homologues of BKC see Fig. 10). Using this BGE, the region around 27 min corresponded to the APEs with a low number of ethoxy units and to de-ethoxylated APs, which are of interest in environmental samples. Thus, the wide migration time window between the APE and LAS regions is an interesting feature of this BGE, since these two types of surfactants are found in environmental samples.

Calibration curves were obtained using both the two industrial NPEs indicated in Section 2.2 and the Fluka standard. Solutions containing increasing NPE concentrations of up to 3 mg·mL^{-1} were injected. NPE was quantified as the sum of the areas of all the homologue peaks. With the three NPEs, linearity was lost for concentrations higher than 2 mg·mL^{-1}. Sensitivities were obtained with

Table 1. Analysis of commercial samples

Samples	Declared %)	Found %)[a)]
Industrial heavy-duty acid degreaser	2.0	1.86±0.08 1.98)
Industrial hard-surface alkaline cleaner	5.0	4.74±0.11 5.04)
Industrial disinfectant cleaner	5.0	4.92 ± 0.17 5.23)
Liquid detergent for washing machines	4.9	5.04±0.05 4.91)
Gel detergent for washing machines I)	13.6	14.08±0.15 13.73)
Gel detergent for washing machines II)	10.9	11.74±0.26 11.4)
Household wool detergent	2.4	2.90 ± 0.2 2.8)
Household linen detergent	4.4	4.52 ± 0.08 4.41)
Household color-clothes detergent	6.7	6.80 ± 0.08 6.63)
Household ammoniacal cleaner	0.5	0.51 ± 0.01 0.50)
Polishing cleaner	1.7	1.89 ± 0.14 1.84)

a) Obtained from five triplicated injections; values referred to the Fluka standard, with the mean referring to the respective industrial NPE within parenthesis standard deviation was the same)

Table 2. Figures of merit for the NPE standard Fluka)

Figure of merit	Value
Intraday migration time[a)]	1.2%
Interday migration time[b)]	4.3%
Peak area repeatabilities[a)] at 50 μg·mL^{-1}	1.7%
Peak area repeatabilities[a)] at 500 μg·mL^{-1}	1.4%
Peak area repeatabilities[b)] at 50 μg·mL^{-1}	5.6%
Peak area repeatabilities[b)] at 500 μg·mL^{-1}	4.9%
Detection limits for a signal-to-noise ratio of 3 n = 8)	28.4 μg·mL^{-1}

a) As relative standard deviation with 30 degrees of freedom six daily series of six experiments each)
b) As the relative standard deviation of the daily means multiplied by $6^{1/2}$ 5 degrees of freedom)

seven evenly spaced points located within the linear range. No differences were observed between the electropherograms of the three NPEs, however, the slopes of the three calibration curves differ slightly, which was probably due to differences in purity *e.g.*, the Fluka standard was 90% pure). For the analysis of industrial products, the NPE contents was calculated with reference to the Fluka standard; however, in order to compare the found and declared concentrations, the found values were also calculated with reference to the same industrial NPE used to manufacture each product. The results of Table 1 showed a satisfactory agreement for the wide variety of products which were analyzed.

Figures of merit are given in Table 2. The limits of detection were calculated for a peak area equal to three times the standard deviation of the areas of eight injections of a 50 μg·mL^{-1} NPE solution. The detection limit of *ca.* 28 μg·mL^{-1} of total NPE compares favorably with those reported in the literature for HPLC and capillary electrophoresis with UV detection, *e.g.*, 37 and 100 μg·mL^{-1}, respectively [22], although these values are much higher than those obtained using HPLC with fluorescence *ca.* 0.2 ng·mL^{-1}, with previous Soxhlet extraction) [18] and mass spectrometry detection below 1 ng·mL^{-1}) [51]. Intra- and interday repeatabilities were calculated from six series of six experiments performed daily during consecutive days. Repeatabilities were evaluated at 50 and 500 μg·mL^{-1}.

4 Concluding remarks

APEs can be separated with homologue resolution by MEKC with a borate buffer of pH 8.5 containing a bile salt. At a given bile salt concentration, the best resolution is achieved with SDC rather than using SC. In the presence of small or moderate amounts of an organic solvent, the baseline improves significantly, whereas the resolution can increase or decrease slightly. A procedure for the determination of APEs with optimum resolution between the homologues has been proposed. Also, this provides a fingerprint of the APE, which can be used to determine the average number of ethoxy units and other parameters in product quality control, to characterize unknown products, to monitor biodegradation processes and in toxicity and environmental studies. A modified procedure with improved selectivity, useful for the single-run determination of absorbing nonionic, cationic and anionic surfactants in industrial and household cleaning products is also proposed. Nonionic mainly NPEs) and anionic surfactants mainly LAS) are usually found together in cleaning products, thus the proposed procedure is of interest for quality control purposes. A region which is adequate for the identification and evaluation of APEs with a low number of ethoxy units and de-ethoxylated APs is present in the electropherograms obtained with the two recommended BGEs.

This work was partially supported by QUÍMICAS ORO San Antonio de Benagéber, Spain). Some of the industrial products used were kindly donated by HELIO Quart de Poblet, Spain). J. M. H-M is beneficiary of a fellowship from the Conselleria de Cultura, Educació I Ciència de la Generalitat Valenciana, Comunitat Valenciana, Spain.

Received July 19, 2000

5 References

[1] APE Research Council, http://www.aperc.org.
[2] Maguire, R. J., *Water Qual. Res. J. Canada* 1999, *34*, 37–78.
[3] Giger, W., Ahel, M., Koch, M., Laubscher, H. U., Schaffner, C., Schneider, J., *Wat. Sci. Tech.* 1987, *19*, 449–460.
[4] Giger, W., Brunner, P. H., Schaffner, C., *Science* 1984, *225*, 623–625.
[5] Jobling, S., Sumpter, J. P., *Aquat. Toxicol.* 1993, *27*, 361–372.
[6] Kaiser, K. L. E., *Water Qual. Res. J. Canada* 1999, *34*, 1 foreword).
[7] Schettler, T., http://www.psr.org/tedfs.htm.
[8] Servos, M. R., *Water Qual. Res. J. Canada* 1999, *34*, 123–177.
[9] Beaton, L., http://www.science.mcmaster.ca/Biology/4S03/LB5.HTM.
[10] Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P., Sumpter, J. P., *Environ. Toxicol. Chem.* 1996, *15*, 194–202.
[11] Routledge, E. J., Sumpter, J. P., *Environ. Toxicol. Chem.* 1996, *15*, 241–248.
[12] Steingraber, S., *Environ. Health Persp.* 1997, *105*, 685–687.
[13] White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., Parker, M. G., *Endocrinology* 1994, *135*, 175–182.
[14] Fernandez, M. F., Pedraza, V., Olea, N., *Cancer J.* 1998, *11*, http://www.infobiogen.fr/agora/journals/cancer/articles.

[15] Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., *Environ. Health Persp.* 1995, *103*, 113–122.

[16] Talmage, S. S., *Environmental and Human Safety of Major Surfactants: Alcohol Ethoxylates and Alkylphenol Ethoxylates*, CRC / Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994. Also available as SDA technical monograph, Cat. No. L1017LBWF. Also available from National Technical Information Service NTIS), US Dept. of Commerce, Springfield, VA, pub. no. 703-605-6000 and 800-553-6847, Microfiche PB94-184983, Vol. 2 Nonionic, 1994, and through http://www.sdahq.org.

[17] Lee, H.-B., *Water Qual. Res. J. Canada* 1999, *34*, 3–35.

[18] Marcomini, A., Giger, W., *Anal. Chem.* 1987, *59*, 1709–1715.

[19] Ahel, M., Giger, W., *Anal. Chem.* 1985, *57*, 1577–1583.

[20] Ahel, M., Giger, W., *Anal. Chem.* 1985, *57*, 2584–2590.

[21] Marcomini, A., Capri, S., Giger, W., *J. Chromatogr.* 1987, *403*, 243–252.

[22] Heinig, K., Vogt, C., Werner, G., *J. Chromatogr. A.* 1996, *745*, 281–292.

[23] Heinig, K., Vogt, C., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997, *359*, 202–206.

[24] Ahel, M., Conrad, T., Giger, W., *Environ. Sci. Technol.* 1987, *21*, 697–703.

[25] Wallingford, R. A., *Anal. Chem.* 1996, *68*, 2541–2548.

[26] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal. Chem.* 1984, *56*, 111–113.

[27] Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., *Anal. Chem.* 1985, *57*, 834–841.

[28] Bullock, J., *J. Chromatogr.* 1993, *645*, 169–177.

[29] Vogt, C., Heinig, K., *Tenside Surf. Det.* 1998, *35*, 470–475.

[30] Heinig, K., Vogt, C., Werner, G., *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997, *357*, 695–700.

[31] Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 1997, *780*, 3–40.

[32] Muijselaar, P. G., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1997, *780*, 41–61.

[33] Terabe, S., *Trends Anal. Chem.* 1989, *8*, 129–134.

[34] Nishi, H., Tsukasa, F., Matsuo, M., Terabe, S., *J. Chromatogr.* 1990, *498*, 313–323.

[35] Cole, R., Sepaniak, M., Hinze, W., Gorse, J., Oldiges, K., *J. Chromatogr.* 1991, *557*, 113–123.

[36] Citterio, A., Sebastiano, R., Lucchini, D., *11th International Symposium on Capillary Electroseparation Techniques*, October, 4–7, 1998, Venice, Italy.

[37] Bumgarner, J. G., Khaledi, M. G., *J. Chromatogr. A* 1996, *738*, 275–283.

[38] Clothier Jr., J. G., Daley, L., Tomellini, S. A., *J. Chromatogr. B* 1996, *683*, 37–46.

[39] Clothier Jr., J. G., Tomellini, S. A., *J. Chromatogr. A* 1996, *723*, 179–187.

[40] Small, D. M., *The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism*, Plenum Press, New York 1971, Chapter 8, pp. 249–356.

[41] Small, D. M., *Amer. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser.* 1968, *84*, 31.

[42] Small, D. M., Penkett, S. A., Chapman, D., *Biochim. Biophys. Acta* 1969, *176*, 178–189.

[43] Conte, G., Di Blasi, R., Giglio, E., Paretta, A., Pavel, N. V., *J. Phys. Chem.* 1984, *88*, 5720–5724.

[44] Esposito, G., Giglio, E., Paretta, A., Zanobi, A., *J. Phys. Chem.* 1987, *91*, 356–362.

[45] Campanelli, A. R., De Sanctis, E., Chiessi, E., D'Alagni, M., Giglio, E., Scaramuza, L., *J. Phys. Chem.* 1989, *93*, 1536–1542.

[46] Coello, A., Meijide, F., Rodríguez-Nuñez, E., Vázquez-Tato, J., *J. Pharm. Sci.* 1996, *85*, 9–15.

[47] Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M., Terabe, S., *J. Chromatogr.* 1990, *515*, 233–243.

[48] Cole, R., Sepaniak, M., Hinze, W., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1990, *13*, 579–582.

[49] Terabe, S., Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M., *J. Microcol. Sep.* 1989, *1*, 234–242.

[50] Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E. F., Mongay-Fernández, C., Ramis-Ramos, G., *J. Chromatogr. A* 2000, *895*, 227–235.

[51] Evans, K. A., Dubey, S. T., Kravetz, L., Dzidic, I., Gumulka, J., Mueller, R., Stork, J. R., *Anal. Chem.* 1994, *66*, 699–705.