

**COLABORACIÓN ESPECIAL****EMPLEO DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO HERRAMIENTA  
PARA LA DETERMINACIÓN DE TÓXICOS EN ALIMENTOS:  
HACIA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA****Roberto Romero González, José Luis Fernández Moreno, Patricia Plaza Bolaños, Antonia Garrido Frenich y José Luis Martínez Vidal.**

G. I. Química Analítica de Contaminantes. Dpto. de Química Analítica, Universidad de Almería.

**RESUMEN**

En los alimentos se pueden encontrar un gran número de sustancias tóxicas, tales como plaguicidas, antibióticos y toxinas, presentando distintos orígenes (naturales o sintéticos) y niveles de toxicidad para la salud humana. Este tipo de compuestos se encuentran generalmente a muy bajas concentraciones en matrices muy complejas, por lo que es necesario la utilización de metodologías lo más fiables posibles. En este sentido, el empleo de las técnicas cromatográficas (de gases y de líquidos) acopladas a detectores de espectrometría de masas ha permitido la detección adecuada de este tipo de sustancias en los alimentos a concentraciones extremadamente bajas. Por ello, y en función de las características del contaminante, se debe elegir la técnica cromatográfica que posibilite una mejor separación del contaminante de los interferentes presentes en la matriz, así como de los contaminantes entre sí. Esta metodología proporciona datos de gran valor que mejoran nuestro conocimiento de la Salud Pública a través de la Seguridad Alimentaria.

**Palabras clave:** Seguridad alimentaria. Tóxicos y Contaminantes. Cromatografía. Espectrometría de Masas.

**ABSTRACT****Using Mass Spectrometry as a Tool  
for Testing for Toxic Substances  
in Foods: toward Food Safety**

A large number of toxic substances, such as pesticides, antibiotics and toxins from different sources (natural or man-made) and different degrees of toxicity for human health can be found in foods. This type of compounds are generally found at very low concentrations in highly complex matrices, it therefore being necessary for the most highly reliable methodologies possible to be used. In this regard, the use of gas and liquid chromatography techniques coupled to mass spectrometry detectors has made it possible to properly detect this type of substances in foods at extremely low concentrations. Therefore, depending upon the characteristics of the contaminant, one must select the chromatography technique which affords the possibility of best separating the contaminant from the interfering substances present in the matrix, as well as from the contaminants amongst one another. This methodology provides highly valuable data enhancing our knowledge of Public Health through Food Safety.

**Key words:** Food safety. Toxics and contaminants. Chromatography. Mass spectrometry.

---

Correspondencia:  
Roberto Romero González,  
Departamento de Química Analítica,  
Universidad de Almería,  
Ctra. Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano,  
04120, Almería.  
Correo electrónico: romero@ual.es

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la seguridad alimentaria es una de las grandes preocupaciones de la sociedad, como se ha podido percibir ante los fenómenos relacionados con “el mal de las vacas locas”, la contaminación de pollos con dioxinas, o el más reciente problema en el que se han encontrado plaguicidas ilegales, como el isofenfos metil en vegetales. Por ello, la sociedad manifiesta constantemente una inquietud creciente hacia la toxicología alimentaria y demanda una información cada vez más completa sobre la presencia de tóxicos en alimentos. Una prueba de este interés es la preocupación por parte tanto de los organismos oficiales como de la industria alimentaria en controlar la presencia de estas sustancias en productos alimentarios. A nivel nacional se puede destacar la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), entre cuyos objetivos está el reducir los riesgos de enfermedades transmitidas por alimentos así como garantizar la eficacia de los sistemas de control de los mismos, coordinando a las distintas administraciones públicas competentes en materia de seguridad alimentaria. De igual forma, a nivel europeo destaca la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), siendo una de sus funciones la evaluación de riesgos y la comunicación de los mismos. El lema “de la granja a la mesa” resume el espíritu de la EFSA, incidiendo en el control de cada punto de la cadena alimentaria para velar eficazmente por la salud de los consumidores. Así, la Unión Europea, mediante la elaboración del “Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria”<sup>1</sup> estableció las bases del cambio al que se está viendo sometida la industria alimentaria desde hace algunos años, reforzando el control y la detección de contaminantes en alimentos y estableciendo límites para varios contaminantes. De igual forma, se han publicado diversos documentos, entre los que destaca el Reglamento (CE) N° 178/2002<sup>2</sup>, por el que

se señalan los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, fijando los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Para conseguir el nivel de protección deseado, se debe disponer de datos fiables, que permitan una adecuada evaluación de riesgos con la consiguiente toma de decisiones. En este sentido, el control toxicológico de los alimentos es un punto crucial y de gran importancia para la salud pública. Así, es imprescindible certificar que los alimentos disponibles en el mercado a disposición de los consumidores están libres de productos tóxicos o de residuos de éstos y si se encuentran presentes que éstos no superan los valores máximos fijados por la legislación<sup>3,4</sup>. Esto implica que los alimentos estén sometidos a controles privados y públicos relativos a la inocuidad de los mismos, es decir, si hay presencia o ausencia de contaminantes y que estos superen o no las concentraciones máximas permitidas. Para ello es necesario recurrir a laboratorios de control y análisis que determinen las concentraciones de los residuos en el alimento y verifiquen el cumplimiento de la legislación. Es entonces cuando el productor, el intermediario, el vendedor, las autoridades y, en definitiva, toda la cadena de elementos implicados en el consumo de un alimento, están seguros de la inocuidad del mismo. Además, es necesario que los resultados ofrecidos por el laboratorio vengán acompañados de una garantía de calidad, es decir, que los resultados analíticos se apoyen sobre un sistema de calidad que asegure la fiabilidad de los análisis.

Con objeto de poder cumplir con todos estos requerimientos es necesario el empleo de metodologías analíticas apropiadas que permitan la correcta identificación y cuantificación de estos compuestos. En general, dichas metodologías deben ser capaces de proporcionar una alta sensibilidad, debido a las bajas concentraciones a

las que pueden encontrarse. Deben ser selectivos, puesto que es necesario distinguir los analitos entre sí, y de los interferentes, así como ofrecer una fiabilidad elevada en la cuantificación, incluso a niveles traza. Dentro de las técnicas existentes hoy en día destacan el empleo de biosensores, Enzima Linked Inmunoabsorbent Assay (ELISA) o cromatográficas<sup>5-7</sup>; estas últimas suelen cumplir con estos requisitos, ya que por un lado permiten el análisis multiresiduo, siendo ideales para la determinación de varios compuestos en un solo análisis, y a continuación, en función del tipo de detector empleado, ofrecer una elevada sensibilidad. En este sentido, pueden emplearse numerosos detectores como los espectrofotométricos hasta los basados en resonancia magnética nuclear, pasando por detectores de captura electrónica o de espectrometría de masas<sup>8,9</sup>. Sin embargo, la Decisión de la Comisión, 2002/657/CE<sup>10</sup>, relativa al funcionamiento de los métodos analíticos para la determinación de contaminantes en alimentos y la interpretación de los resultados, indica que los métodos basados sólo en análisis cromatográficos sin el empleo de la espectrometría de masas para la detección no son apropiados para la confirmación de los mismos. En este contexto, los laboratorios de análisis alimentario se ven obligados al empleo de la espectrometría de masas para la determinación de contaminantes en alimentos, con objeto de asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos, siendo por tanto una herramienta de obligado uso en los mismos. De hecho, la UE señala este tipo de detección como el idóneo para la correcta identificación de compuestos, empleando para ello un sistema de identificación por puntos, indicando que para compuestos legislados se necesitan al menos 3 puntos de identificación, mientras que para los no autorizados o sustancias anabolizantes se necesitarían al menos 4 puntos<sup>10</sup>.

El presente trabajo intenta describir brevemente los principios básicos sobre los

que se basa la espectrometría de masas cuando se acopla a técnicas cromatográficas y ofrecer una visión de las principales aplicaciones de la técnica en laboratorios agroalimentarios, destacando las ventajas de su empleo así como su potencialidad para la determinación de contaminantes en alimentos y su consiguiente repercusión en las políticas de Salud Pública de los organismos oficiales.

## FUNDAMENTO DE LOS DETECTORES DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El empleo de técnicas cromatográficas permite la determinación simultánea de varios contaminantes presentes en una muestra. Sin embargo, el empleo de detectores tradicionales como UV-visible, de fluorescencia o de captura electrónica, proporcionan una gran incertidumbre en los resultados ofrecidos por los laboratorios, aumentando el riesgo de falsos positivos y negativos<sup>11</sup>. En este sentido, el acoplamiento de un espectrómetro de masas a un sistema de separación cromatográfica ha permitido que se puedan identificar y cuantificar con una gran fiabilidad sustancias presentes en alimentos, puesto que un falso positivo puede desembocar en la paralización errónea de un determinado cargamento de alimentos, así como un falso negativo puede permitir que lleguen al mercado alimentos que no cumplen con la legislación. Este acoplamiento, que se realiza a través de una interfase que "conecta" el sistema cromatográfico con el detector, presenta ciertos problemas que en el caso de la cromatografía de gases (GC) se resolvieron hace tiempo, posibilitando que dicha técnica sea considerada de rutina en los laboratorios agroalimentarios para la determinación de contaminantes volátiles y apolares, mientras que el acoplamiento cromatógrafo de líquidos (LC)-espectrómetro de masas es mucho más complejo, encontrándose numerosos avances en los últimos años<sup>12</sup> que han permiti-

do un espectacular desarrollo de dicha técnica. Esto ha posibilitado la rápida determinación de sustancias más polares o termolábiles en los alimentos con un alto grado de fiabilidad.

El proceso de análisis por espectrometría de masas es sumamente complejo por lo que a continuación se explica solamente de forma muy resumida un fundamento del mismo. La espectrometría de masas está basada en el diferente comportamiento que presentan los iones que se forman por las diferentes técnicas de ionización, al atravesar campos eléctricos y magnéticos. Así dichos iones son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) y detectados posteriormente. Un espectrómetro de masas consta de varios componentes básicos:

— Dispositivo de introducción de la muestra

— Cámara de ionización o fuente, donde se generan los iones a partir de las sustancias químicas a analizar

— Analizador, que diferencia los iones generados en función de su relación  $m/z$

— Detector que produce una señal eléctrica amplificada para cada uno de los iones generados

Así, una vez separadas las sustancias en el cromatógrafo, es necesario ionizar las moléculas y obtener iones en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización y actualmente existen diferentes técnicas que permiten llevar a cabo dicha ionización<sup>13</sup>. Entre las más importantes destacan la ionización electrónica, que se basa en el bombardeo de electrones o la ionización química, donde la ionización se realiza a través de choques con moléculas previamente ionizadas como metanol. Para el acoplamiento con los cromatógrafos de líquidos, la ioni-

zación a presión atmosférica (API) ha tenido un gran éxito ya sea mediante la modalidad de electrospray o la denominada ionización química a presión atmosférica<sup>14</sup>, siendo la más empleada en la mayoría de los equipos.

Una vez generados los iones son introducidos en el analizador, existiendo distintas modalidades, siendo el más usado el denominado cuadrupolo debido a su gran robustez para análisis de rutina y su relativo bajo costo comparado con otros como la trampa de iones o los analizadores de tiempo de vuelo<sup>14</sup>. Este analizador (figura 1) se compone de 4 barras alargadas conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos a los que se le aplica un voltaje variable y, para un voltaje dado, sólo los iones con una  $m/z$  determinada presentarán una trayectoria estable y podrán ser detectados (iones resonantes) mientras que el resto son expulsados del cuadrupolo y no llegan al detector (iones no resonantes).

Estos analizadores pueden trabajar en dos modos básicos. Si operan en modo “barrido completo” o “full scan”, los voltajes aplicados varían en función del tiempo para obtener un espectro de masas del compuesto, proporcionando información muy precisa relacionada con la identidad del producto. Sin embargo, también se puede fijar un voltaje determinado seleccionando así un solo ión, originando una excelente sensibilidad con una alta especificidad, siendo ideal con fines cuantitativos de trazas y ultratrazas<sup>15</sup>.

En función del tipo de analizador es posible repetir el ciclo ruptura-detección de fragmentos generados, apareciendo lo que se denomina espectrometría de masas en tándem (MS)<sup>n</sup>. El objetivo es obtener más información estructural mediante la fragmentación de iones aislados, así como mejorar la selectividad y sensibilidad para el análisis cuantitativo.

En este sentido, los analizadores más habituales son la trampa de iones y el triple cuadrupolo. En el primero la ruptura y aislamiento se produce en el tiempo, mientras que para el segundo dicho proceso se realiza en el espacio, presentando ambos analizadores ventajas y desventajas<sup>16</sup>, empleándose ambos en análisis de rutina. En concreto, el triple cuadrupolo está compuesto de tres cuadrupolos colocados consecutivamente, de los cuales el primero y el tercero seleccionan los iones producto de interés, y el segundo actúa como celda de colisión. Este segundo cuadrupolo es el que permite la realización de espectrometría de masas en tandem, en este caso MS-MS, puesto que el ciclo ruptura-detección se realiza dos veces. Físicamente se aceleran los iones (denominados precursores) desde el primer cuadrupolo hacia el segundo en presencia de un gas de colisión (generalmente argón o helio), pudiendo obtenerse distintas fragmentaciones.

El triple cuadrupolo se puede emplear de diversas maneras como barrido de iones productos, barrido de iones precursores o pérdida neutra, siendo lo más habitual monitorizar una reacción (selection reaction monitoring) que consiste en que ambos analizadores (primer y tercer cuadrupolo) registran solo unas masas seleccionadas. En esta modalidad los iones seleccionados por el primer analizador sólo son detectados si producen una fragmentación específica. Al no hacer un barrido de masas y al medir sólo una masa durante todo el tiempo se puede aumentar la sensibilidad.

De esta forma, teniendo en cuenta el criterio de identificación por puntos indicado por la UE<sup>10</sup>, por cada ión precursor se obtiene un punto de identificación y por cada ión producto 1,5 puntos por lo que, por ejemplo, mediante el empleo de un triple cuadrupolo se necesitan al menos dos transiciones más el ión precursor para la correcta identificación de un compuesto ilegal.

## APLICACIONES DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS COMO DETECTOR

Existe una gran variedad de compuestos químicos que por diferentes vías pueden llegar a los productos alimenticios que se consumen cada día. Dentro de éstos se encuentran productos como plaguicidas, medicamentos veterinarios, micotoxinas y acrilamida, para los cuales el empleo de la espectrometría de masas ha posibilitado una detección rápida y fiable, permitiendo determinar dichos compuestos por debajo de los límites regulados por los organismos oficiales en un tiempo de análisis relativamente corto.

Así, en primer lugar podemos destacar la presencia de productos fitosanitarios empleados para combatir las plagas y enfermedades de frutas y hortalizas. Unas buenas prácticas agrarias y un respeto de los plazos de seguridad dan lugar a una reducción de los niveles de plaguicidas empleados por debajo de los límites máximos fijados, evitando riesgo alguno para la salud del consumidor. La problemática aparece cuando se hace uso de plaguicidas no permitidos o registrados, o cuando no se siguen las pautas adecuadas en la aplicación de aquellos productos permitidos.

Los plaguicidas se pueden clasificar en varios grupos en función de su estructura química. De este modo las categorías clásicas de plaguicidas más empleados son: organoclorados (DDT), organofosforados (malatión), carbamatos (propoxur), piretroides (deltametrina), triazinas (atrazina), y ureas sustituidas. La toxicidad de estos compuestos viene determinada por una serie de factores como son la familia a la que pertenece, las cantidades aplicadas, el medio y momento de aplicación, el momento de la recolección, etcétera, todo ello afectando a los niveles de plaguicida en el alimento final. El espectro de toxicidad es muy amplio, incluyendo compues-

tos de alta toxicidad como algunos organofosforados, plaguicidas que teóricamente no son tóxicos para los mamíferos, como algunos reguladores del crecimiento e insecticidas biológicos y finalmente plaguicidas que no presentan efectos tóxicos elevados pero que pueden producir efectos tóxicos tras una exposición crónica, como muchos fungicidas.

Actualmente los productos agrícolas están sometidos a controles privados y públicos, evaluando la presencia de residuos de plaguicidas presentes y que no superen las concentraciones máximas permitidas<sup>15</sup>.

Otro grupo que está cobrando una gran importancia en los últimos años son los productos farmacológicos y promotores del crecimiento dentro del sector veterinario. Estos productos ayudan a controlar las infecciones bacterianas de los animales y a preservar su salud y crecimiento. Estas medicaciones son administradas a través del agua o como aditivos en los piensos. La aparición de residuos veterinarios indeseados en los productos de alimentación se debe a la administración de medicamentos prohibidos, o a un uso inadecuado, sin respeto de los plazos de seguridad de medicamentos permitidos<sup>17</sup>. Dentro de los distintos fármacos de uso veterinario se pueden distinguir numerosas clases, entre las que destacan las sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas, macrólidos y antihelmínticos<sup>18</sup>. Tanto las tetraciclinas, quinolonas y macrólidos son agentes bacterianos de amplio espectro y su presencia en los alimentos de origen animal supone un riesgo para la salud, ya que pueden resultar tóxicos y dar lugar a reacciones de resistencia bacteriana que a través de la cadena alimentaria puede ser transferida a los consumidores<sup>19</sup>. De igual forma, los antihelmínticos están considerados como unos poderosos agentes antiparasitarios, mientras que las sulfonamidas son un potente grupo bacteriostático potencialmente carcinógeno.

Dentro de las sustancias tóxicas que pueden aparecer de forma natural en los alimentos se encuentran las micotoxinas, que son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos en alimentos y derivados bajo ciertas condiciones ambientales. El crecimiento de estos hongos y la aparición de las micotoxinas puede ocurrir en cualquiera de las etapas que recorren los alimentos: antes de la recogida, tras la cosecha, durante el almacenamiento, durante el procesado o al comerlos, debido a condiciones ambientales extremas y afectando a la calidad de los alimentos<sup>20</sup>. Existen diferentes tipos de micotoxinas, entre las más importantes encontramos: la patulina (manzanas), las aflatoxinas (frutos secos, maíz, especias,...), la ocratoxina A (cereales, especias, vino, cerveza, zumos,...), los tricotecenos (cereales), zearalanona (maíz) o la fumonisina (maíz)<sup>21</sup>. Las micotoxinas pueden causar una diversidad de efectos tóxicos en humanos y animales. Actualmente se ha demostrado que algunos de estos tóxicos son cancerígenos, genotóxicos y pueden afectar al hígado, riñón y al sistema inmunológico. Por ejemplo, se piensa que la ingesta continuada de aflatoxinas está relacionada con el cáncer de hígado en personas afectas por la hepatitis B. Así se considera la aflatoxina B<sub>1</sub> como uno de los agentes causantes del cáncer de hígado más potentes junto a la M<sub>1</sub>, que es un carcinógeno genotóxico de especial relevancia para aquellos consumidores habituales de leche<sup>21</sup>.

Por otro lado, existen ciertos tóxicos que pueden aparecer como resultado del cocinado de los alimentos, los cuales no provienen de una aportación directa intencionada, sino como consecuencia de las reacciones químicas que tienen lugar cuando los productos alimenticios se someten a temperaturas elevadas. Entre estos tóxicos cabe destacar la acrilamida y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)<sup>22</sup>. La acrilamida se forma cuando alimentos con alto contenido en carbohidratos y bajo en proteínas son procesados o cocinados a altas temperatu-

ras. Los principales alimentos en los que aparece son las patatas fritas, el café, los pasteles, pan y tostadas. En cuanto a los efectos tóxicos de esta sustancia diferentes estudios han demostrado que una exposición prolongada puede ocasionar daños en el sistema nervioso, sistema reproductivo y en el material genético, además de considerarse como una molécula con propiedades carcinogénicas y mutagénicas<sup>23</sup>. Pero a pesar de esto, se ha llegado a la conclusión de que la mayoría de estos efectos son improbables en el ser humano si se tiene en cuenta que el promedio de consumo es muy reducido.

Por otro lado, los PAHs son un grupo muy elevado de compuestos, más de 100 familias diferentes, los cuales entran a formar parte de los denominados compuestos orgánicos persistentes (COPs). Esto se debe a la capacidad de mantenerse estables durante largos períodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas. Los PAHs tienen su origen en la combustión incompleta de la materia orgánica y pueden llegar a los alimentos como resultado de la contaminación ambiental, los procesos de secado y ahumado, además de por el proceso de cocinado a elevadas temperaturas con contacto directo con el fuego. Los principales impactos de los PAHs en la salud humana se centran en sus propiedades genotóxicas, es decir causan daños al material genético (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). Los más potentes carcinógenos son el benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno y el dibenz(ah)antraceno.

Finalmente conviene destacar la presencia de contaminantes ambientales en alimentos. De esta forma, las dioxinas y los bifenilos policlorados (PCBs) son un grupo de productos químicos tóxicos y persistentes entre cuyos efectos en la salud humana y el medio ambiente se incluyen la toxicidad dérmica, la inmunotoxicidad, los efectos reproductivos, los efectos perturbadores del sistema endocrino y los efectos cancerí-

genos. Las dioxinas son principalmente subproductos no intencionales de una serie de procesos químicos, así como de casi todos los procesos de combustión, mientras que los PCB son sustancias producidas intencionalmente, que han sido fabricados durante décadas antes de su prohibición debida a su toxicidad, persistencia y efectos bioacumulativo. La vía de exposición principal de la población a éste tipo contaminantes es a través de los alimentos, más concretamente el pescado y el marisco. Los suelos, los sedimentos y el entorno acuático son depósitos importantes dada la persistencia de estos contaminantes en el medio ambiente. La vía más importante de exposición humana a las dioxinas es el consumo de alimentos y los productos derivados del pescado<sup>24</sup>.

Como se ha visto, existen una variedad de compuestos químicos que por diferentes vías pueden llegar a los productos alimenticios que se consumen cada día. Éstos pueden considerarse como microcontaminantes, ya que la concentración a la que se pueden encontrar es muy baja a nivel de traza. Sin embargo, a pesar de esto, está completamente demostrada su peligrosidad para los consumidores. Así, los organismos legislativos europeos como la EFSA han tomado medidas para fijar los límites máximos a los que se pueden encontrar estas sustancias en cada tipo de alimento.

Las exigentes legislaciones actuales que limitan la presencia de estos compuestos a unas concentraciones realmente bajas, de trazas, como se ha comentado anteriormente, requieren de potentes herramientas instrumentales que permitan detectar su presencia a esos niveles. De ahí, la importancia que ha adquirido la cromatografía tanto de gases como de líquidos acoplada a detectores de espectrometría de masas, ya que son equipos tecnológicos de extraordinaria sensibilidad y capacidad para identificar y confirmar la presencia estos compuestos con un elevado grado de seguridad.

Existen numerosas publicaciones donde se pone de manifiesto la capacidad de la espectrometría de masas para la determinación de estos contaminantes en alimentos<sup>14,15,25-29</sup>. De forma general, se puede indicar que la metodología a utilizar se divide en varias etapas que comprenden la extracción de analitos de la muestra; etapa de limpieza o “clean-up”, para eliminar una parte importante de los interferentes, separación de los distintos compuestos mediante técnicas cromatográficas (GC o LC) y, finalmente, una detección sensible y selectiva mediante espectrometría de masas. En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos representativos de la aplicación de dicha técnica de detección donde se puede observar el alto grado de sensibilidad alcanzado

para la determinación de estos contaminantes en muestras tan complejas como leche, pescado y miel.

En función de la naturaleza del tóxico a determinar se aplica la combinación de técnicas más adecuada. De esta manera, para el análisis de compuestos de baja-media polaridad, la técnica más apropiada es la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). De hecho, en la década anterior, la GC-MS ha sido la técnica más ampliamente usada para la detección de la mayoría de los contaminantes orgánicos, puesto que se trata de una técnica reproducible entre distintos laboratorios<sup>47</sup>. En la figura 2 se muestra un ejemplo de determinación de plaguicidas

Tabla 1

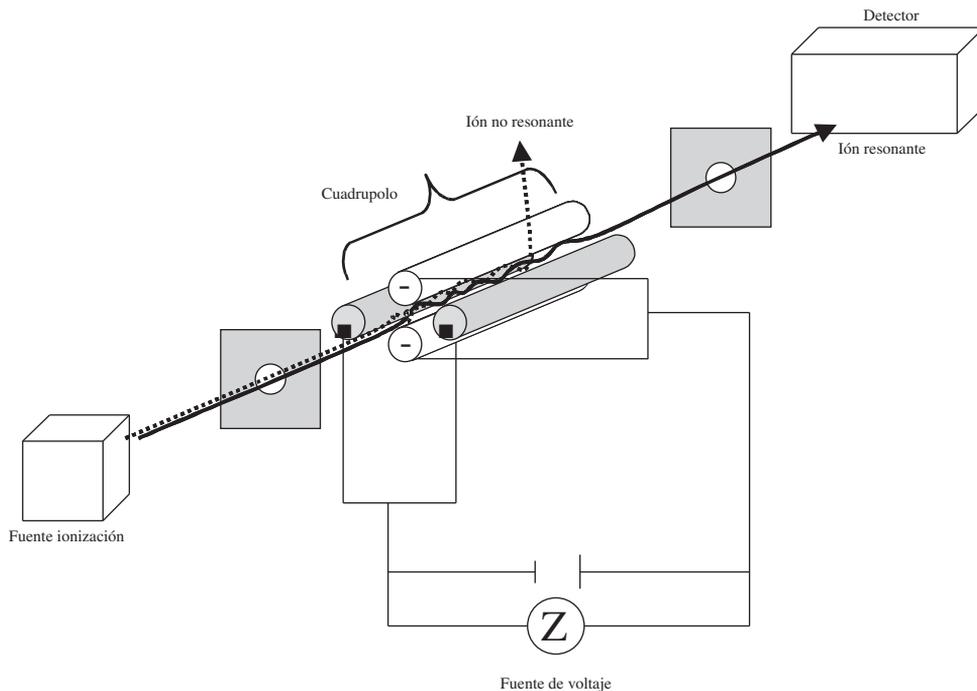
## Determinación de contaminantes en alimentos mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas\*

Compuestos analizados	Matriz	Técnica de separación	Analizador de masas	Límite de detección ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Referencia
PAHs	Marisco	GC	Q	1.4-20.3	30
PAHs	Aceite de oliva	HS-GC*	QqQ	0.02-0.06	31
PAHs + Plaguicidas	Aceite de oliva	GC	IT	0.1-3.8	32
Plaguicidas	Vegetales, frutas	LC	ESI-TOF	0.5-3	33
Plaguicidas	Vegetales grasos	LP-GC*	IT	0.01-2.5	34
Plaguicidas	Hígado	GC	QqQ	0.01-8.7	35
Plaguicidas	Vegetales	LC	ESI-Q	0.06-2.7	36
Plaguicidas + PCBs	Huevo	GC	Q	0.2-0.7	37
PCBs	Aceite de maíz	GC	IT	0.0004-0.002	38
Acilamida	Chocolate en polvo, cacao, café	LC	ESI-QqQ	9.2	39
Acilamida	Cereales de desayuno, galletas	LC	ESI-QqQ	15- 20	40
Acilamida	Patatas, pan, salvado, centeno, fritos	LC	ESI-QqQ	5	41
Micotoxinas	Semillas y alimentos	UPLC*	ESI-QqQ	0.01-0.7	42
Tricotecenos	Maíz	LC	APCI, ESI-QTrap	0.3-3.8	43
Cloramfenicol	Leche	LC	APCI-QqQ	0.03	44
Fluoroquinolonas y quinolonas	Salmón	LC	ESI-TOF	1-3	45
Quinolonas, tetraciclinas, flumequina	Miel	LC	ESI-QqQ	0,4-11	46

\* Abreviaturas: GC: Cromatografía de Gases; HS: Extracción por espacio-cabeza; LC: Cromatografía líquida; LP-GC: Cromatografía de gases a baja presión; UPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia; Q: Simple cuadrupolo; QqQ: Tripe cuadrupolo; IT: Trampa de iones; ESI: Electrospray; APCI: Ionización química a presión atmosférica; TOF: Analizador de tiempo de vuelo.

Figura 1

Esquema de funcionamiento de un cuadrupolo



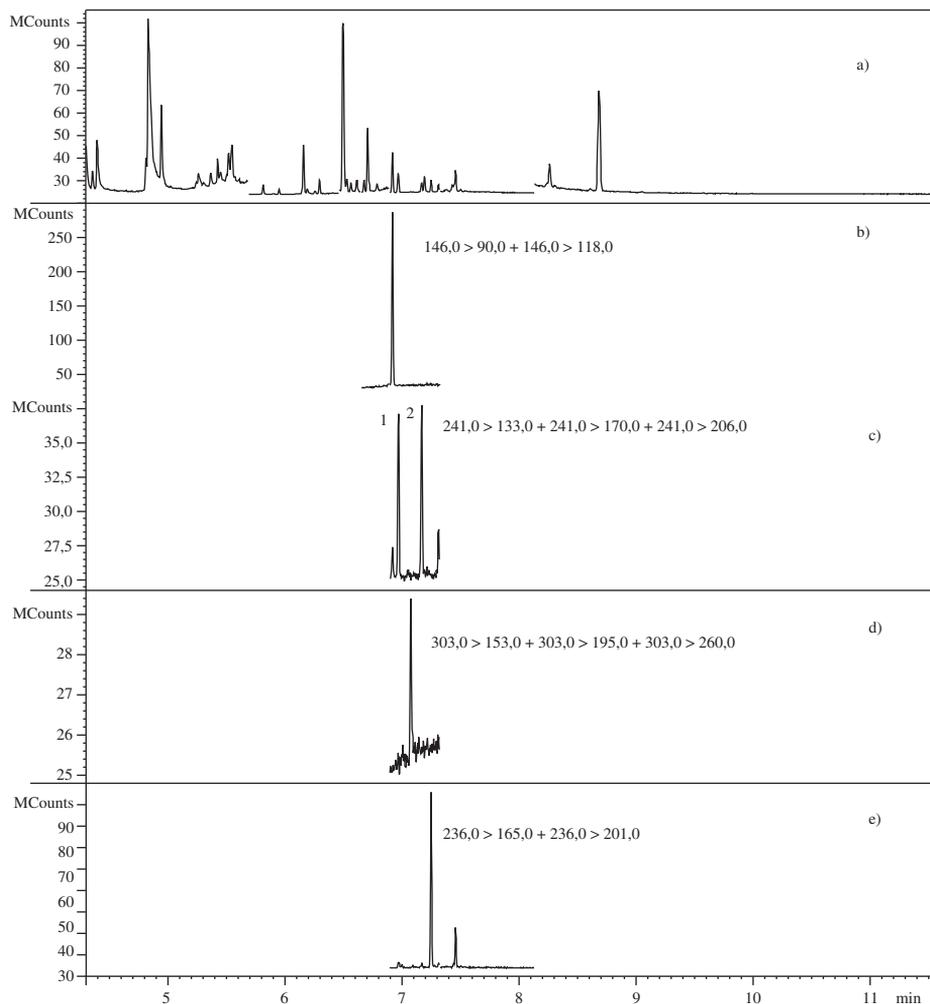
en muestras de hígado de pollo mediante GC-MS-MS<sup>35</sup>. Se puede observar como en el cromatograma total de iones (figura 2 a) es difícil la detección de los plaguicidas, pero cuando se monitorizan solamente las transiciones de los plaguicidas deseados (figura 2b-2e) se consigue una gran sensibilidad y selectividad. Para la determinación del endosulfan  $\alpha$  (figura 2c) se observa otro pico correspondiente al endosulfan  $\beta$  que presenta las mismas transiciones pero que no interfiere para su determinación. Además se puede observar como el aumento de la selectividad conseguida por el empleo de la espectrometría de masas permite discriminar entre plaguicidas que aparecen coeluidos.

Sin embargo para la determinación de compuestos más polares o termosensibles

no es una técnica adecuada, a no ser que se recurra a un proceso de derivatización que hace aumentar el tiempo total de análisis así como su complejidad, debiendo de emplearse la cromatografía de líquidos acoplada también a un detector de masas (LC-MS). Además, la mayoría de los nuevos plaguicidas desarrollados así como los antibióticos son cada vez más polares, por lo que poco a poco, la LC-MS está reemplazando a la GC-MS como técnica de rutina en los laboratorios agroalimentarios. Así, es posible agrupar los compuestos anteriores de modo que micotoxinas, acrilamida, plaguicidas polares y residuos veterinarios se determinan mayoritariamente mediante LC-MS, mientras que PCBs, PAHs, dioxinas y plaguicidas de polaridad baja, mayoritariamente mediante la GC-MS<sup>22,48</sup>.

Figura 2

Cromatograma de una muestra de hígado de pollo fortificada con 50 µg/kg de plaguicidas.  
 a) Cromatograma total de iones; b-e) Cromatograma obtenido monitorizando una sola transición por compuesto  
 b) quinalfos; c) endosulfán a; d) fenamifos; e) o,p'-DDT. 1 y 2 endosulfan α y β, respectivamente

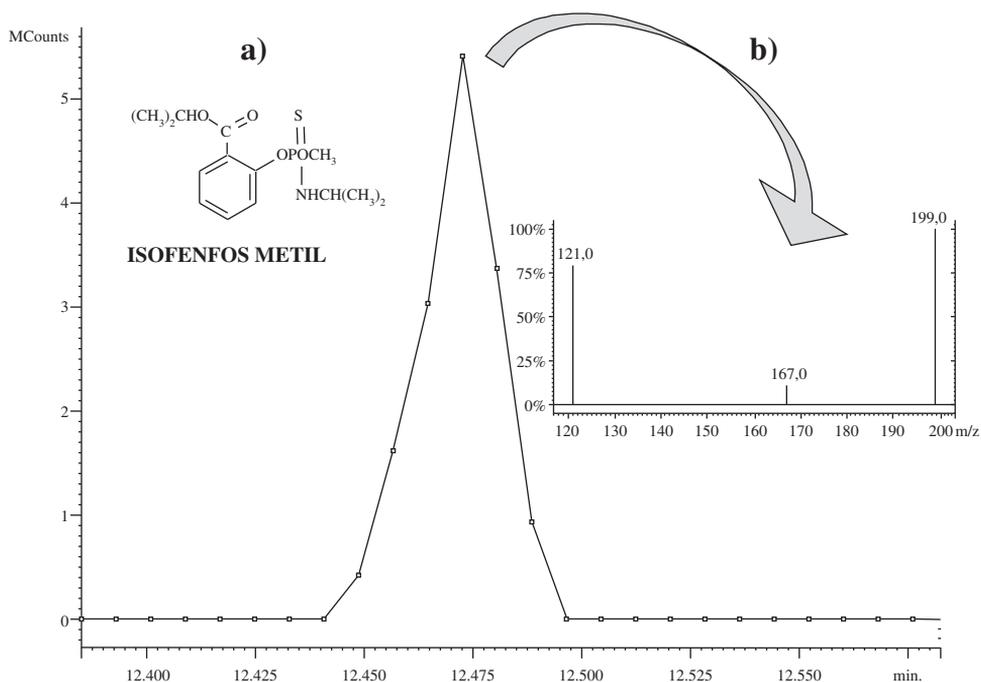


En concreto la LC-MS/MS ha demostrado su gran potencial para el análisis de contaminantes en muestras alimentarias o complejas en general, puesto que evita la aparición de falsos positivos debidos a identificaciones erróneas y permite detectar la presencia del compuesto en cantidades muy bajas, del nivel pg/kg o µg/kg.

Finalmente se puede indicar el reciente problema aparecido en el sector hortícola español con la presencia de isofenfos metil (plaguicida no registrado) en pimientos. El empleo de la espectrometría de masas ha permitido una rápida y correcta identificación de dicho producto en vegetales, como se puede observar en la figura 3, donde se

**Figura 3**

**Determinación de isofenfos metil mediante GC-MS-MS en pimiento: (a) cromatograma y (b) espectro de masas**



muestra el pico cromatográfico del isofenfos metil (separado mediante un cromatógrafo de gases) junto a los iones característicos de dicho compuesto al ser fragmentado y que ha permitido su rápida detección en pimientos contaminados por dicho plaguicida.

### FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Debido al fuerte impacto de la presencia de contaminantes en alimentos, es aún necesario el control para su determinación y conocer si su presencia está por encima de los límites máximos regulados por los organismos oficiales. Sin embargo, hasta ahora todos los esfuerzos se venían centrando en la determinación de la sustancia contaminante primaria, sin prestar dema-

siada atención a los metabolitos o productos de degradación de dichos compuestos. Es por ello que es necesario desarrollar procedimientos de análisis que posibiliten la determinación conjunta tanto del contaminante primario como de sus metabolitos, ampliando la información obtenida mediante los análisis químicos realizados, pudiendo emplearse para ello nuevos espectrómetros de masas como los analizadores de tiempo de vuelo (TOF)<sup>49</sup>, basados en la medida del tiempo que tardan los iones generados y acelerados con igual energía en la fuente de iones en alcanzar un electrodo colector situado a una distancia prefijada. Como los iones poseen la misma energía pero diferentes masas, alcanzan el colector a diferentes tiempos, dependiendo de su masa, carga y energía cinética, permitiendo una determinación muy exacta de las masas moleculares. Asimismo, han sur-

gido nuevos analizadores basados en la combinación de un simple cuadrupolo con el analizador de tiempo de vuelo, permitiendo combinar la simplicidad de un cuadrupolo con la sensibilidad inherente, resolución y exactitud de masas del TOF<sup>50</sup>. De igual forma están apareciendo nuevos analizadores híbridos como el cuadrupolo trampa lineal (QqLIT), que está basado en la utilización del tercer cuadrupolo como trampa de iones, permitiendo mejorar la sensibilidad del proceso de detección, siendo muy útil para la identificación de metabolitos de contaminantes en distintas matrices<sup>51</sup>, así como otro tipo de equipos de alta resolución como el orbitrap<sup>51,52</sup>. Sin embargo y a pesar de la gran calidad de la información que proporcionan y de estar encontrando su propio campo de aplicación dentro de la toxicología alimentaria, su empleo en los laboratorios de rutina suele ser aún muy reducido debido al elevado coste de la instrumentación necesaria, por lo que se espera un aumento en el número de aplicaciones que incluyan estos analizadores en los próximos años.

Además, los laboratorios deben de ir satisfaciendo las cada vez más estrictas legislaciones tanto nacionales como internacionales en relación con la presencia de contaminantes en los alimentos. Esto provoca en los laboratorios agroalimentarios diversos problemas, puesto que se aumenta el número de muestras a analizar, así como hay una mayor variedad de contaminantes a determinar, junto con la necesidad de adaptar los métodos de análisis a las nuevas directivas, ofreciéndose la espectrometría de masas como una poderosa herramienta que permite soslayar parte de los problemas actuales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Comisión de las Comunidades Europeas. Libro Blanco sobre seguridad alimentaria. Bruselas: Comisión de las Comunidades Europeas; 2002.
2. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Reglamento 178/2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria. DOCE núm L31, 1/2/2002.
3. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Reglamento (CE) 472/2002, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. DOCE núm L75, 16/3/2002.
4. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Reglamento (CE) 396/2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. DOCE núm L70, 16/3/2005.
5. Patel P D. (Bio)sensors for measurements of analytes implicated in food safety: a review. *Trends Anal Chem* 2002; 21:96-115.
6. Anklam E, Stroka J y Boenke A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*. 2002; 13:173-83.
7. Toldrá F y Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Sci & Technol*. 2006; 17:482-9.
8. Tekel J y Hatrık S. Pesticide residue analyses in plant material by chromatographic methods: clean-up procedures and selective detectors. *J Chromatogr A*. 1999; 754:397-410.
9. Sendón García R, Sanches Silva A, Cooper I, Franz R y Paseiro Losada P. Revisión of analytical strategies to evaluate different migrants from food packaging materials. *Trends in Food Sci & Technol*. 2006; 17:354-366.
10. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Decisión de la Comisión 2002/657/CE, relativa a la aplicación de la Directiva 96/23/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE núm L221, 17/8/2002.
11. Jansson C, Pihlström T, Österdahl B y Markides K E. A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 2004; 1023:93-104.
12. Niessen WMA. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J Chromatogr A*. 2003; 1000:413-436.

13. Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. 2ª ed. Paris: John Wiley & Sons LTD; 1999.
14. Núñez O, Moyano E y Galcerán MT. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Anal Chem*. 2005; 24:683-703.
15. Picó Y, Blasco C y Font G. Environmental and food applications of LC-tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview. *Mass Spectrometry Reviews*. 2004; 23:45-85.
16. Soler C, Mañes J y Picó Y. Comparison of liquid chromatography using triple quadrupole and quadrupole ion trap mass analyzers to determine pesticide residues in oranges. *J Chromatogr A*. 2005; 1067:115-25.
17. Gentili A, Perret D y Marchese S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends Anal Chem*. 2005; 24:704-33.
18. Balizs G y Hewitt A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2003; 492:105-31.
19. Chee-Sanford C, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N y Mackie RI. Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. *Appl Environ Microbiol*. 2001; 67:1494-502.
20. Sforza S, Dall'Asta C y Marchelli R. Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic techniques/mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006; 25:54-76.
21. Papp E, Otta KH, Zaray G y Mincsovcics E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchem J*. 2002; 73:39-46.
22. Núñez O, Moyano E y Galcerán MT. LC-MS/MS analysis of organic toxics in food. *Trends Anal Chem*. 2005; 24:683-703.
23. Poster DL, Schantz MM, Sander LC y Wise SA. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. *Anal Bional Chem*. 2006; 386:859-81.
24. Santos FJ y Galcerán MT. The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends Anal Chem*. 2002; 21:672-85.
25. Di Corcia A y Nazzari M. Liquid chromatographic-mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J Chromatogr A*. 2002; 974:53-89.
26. Garrido Frenich A, González Rodríguez FJ, Arrebola Liébanas FJ y Martínez Vidal JL. Potentiality of gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry in vanguard and rearguard methods of pesticide residues in vegetables. *Anal Chem*. 2005; 77:4640-8.
27. Blasco C, Font G y Picó Y. Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion trap-triple stage mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005; 1098:37-43.
28. Soler C y Picó Y. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *Trends Anal Chem*. 2006; 26:103-15.
29. Andreu V, Blasco C y Picó Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *Trends Anal Chem*. 2007; doi:10.1016/j.trac.2007.01.010.
30. Navarro P, Cortazar E, Bartolomé L, Deusto M, Raposo J C, Zuloaga O, Arana G, Extebarria N. Comparison of solid phase extraction, saponification and gel permeation chromatography for the clean-up of microwave-assisted biological extracts in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Chromatogr A*. 2004; 1028:10-16.
31. Arrebola FJ, Garrido-Frenich A, González-Rodríguez, Plaza-Bolaños P, Martínez Vidal JL. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oil by a completely automated headspace technique coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2006; 41:822-9.
32. Ballesteros E, García Sánchez A, Ramos Martos N. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006; 1111:89-96.
33. Ferrer I, García-Reyes J F, Mezcua M, Thurman E M, Fernández-Alba AR. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005; 1085:81-90.
34. Fernández Moreno JL, Arrebola Liébanas FJ, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL. Evaluation of different sample treatments for determining pesticide residues in fat vegetable matrices like

- avocado by low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006; 1111:97-105.
35. Garrido Frenich A, Plaza Bolaños P, Martínez Vidal JL. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007; doi:10.1016/j.chroma.2007.01.066.
  36. Romero-González R, Pastor-Montoro E, Martínez-Vidal JL, Garrido-Frenich A. Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006; 20:2701-08.
  37. Valsamaki V I, Boti V I, Sakkas V A, Albanis T A. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. *Anal Chim Acta*. 2006; 573:195-201.
  38. Malavia J, Abalos M, Santos FJ, Abad E, Rivera J, Galceran MT. Analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in vegetable oils samples by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*; doi:10.1016/j.chroma.2007.03.052.
  39. Delatour T, Périsset A, Goldmann T, Riediker S, Stadler RH. Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectroscopy. *J Agri Food Chem*. 2004; 52:4625-31.
  40. Riediker S, Stadler R H. Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;1020:121-30.
  41. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agri Food Chem*. 2002; 50:4998-5006.
  42. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2007; 1143:48-64.
  43. Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, Krska R. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2005; 1062:209-216.
  44. Sørensen LK, Elbæk TH, Hansen H. Determination of chloramphenicol in bovine milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int*. 2003;86:703-6.
  45. Hernando MD, Mezcua M, Suárez-Barcelona JM, Fernández-Alba AR. Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant residues in salmon. *Anal Chim Acta*. 2006; 562:176-84.
  46. Kaufmann A, Roth S, Ryser B, Widmer M, Gugisberg D. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *J AOAC Int*. 2002; 85:853-60.
  47. Quintela O, Cruz A, Concheiro M, De Castro A y López-Rivadulla M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Rev Toxicol*. 2005; 22:7-14.
  48. Careri M, Bianchi F y Corradini C. Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *J Chromatogr A*. 2002; 970: 3-64.
  49. Ibáñez M, Sancho JV, Pozo O y Hernández F. Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study. *Anal Bioanal Chem*. 2006; 384:448-57.
  50. Soler C, Hamilton B, Furey A, James KJ, Mañés J y Picó Y. Liquid Chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry analysis of carbosulfan, carbofuran, 3-hydroxycarbofuran, and other metabolites in food. *Anal Chem*. 2007; 79:1492-501.
  51. Barceló D, Petrovic M. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *Trends Anal Chem*. 2007; 26:2-11.
  52. Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*. 2005; 40:430-43.