

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

Grupo de investigación FQM-297 “Control Analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario”

TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS
ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN
DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN
ALIMENTOS FUNCIONALES**

María Gómez Romero

Granada, Diciembre 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Gómez Romero
D.L.: GR 2024-2011
ISBN: 978-84-694-1435-4



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
EN ALIMENTOS FUNCIONALES**

*Memoria presentada por María Gómez Romero
para optar al grado de Doctor Europeo en Química.*

Granada, 1 de diciembre de 2010

María Gómez Romero

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica

Dr. D. Antonio Segura Carretero
Catedrático del Departamento de Química Analítica



Departamento de Química Analítica
"Profesor Fermín Capitán García"
Campus Universitario Fuentenueva
18071 Granada. España

El Prof. Dr. D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica "Profesor Fermín Capitán" de la Facultad de Ciencias y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix", y Director del grupo de investigación FQM-297 "Control analítico, ambiental, bioquímico y alimentario", de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE:

El trabajo que se presenta en esta tesis doctoral con el título: "**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ALIMENTOS FUNCIONALES**", que ha sido realizado bajo mi dirección y la del Prof. Dr. D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios que el grupo FQM-297 tiene en el Departamento de Química Analítica y también, parcialmente, en las instalaciones que la compañía Bruker Daltonik GMBH tiene en Bremen (Alemania) y en el Departamento de Química Pura y Aplicada de la Universidad de Strathclyde de Glasgow (Reino Unido), reúne todos los requisitos legales, académicos y científicos para hacer que la doctoranda Dña. María Gómez Romero pueda optar al grado de Doctor Europeo en Química.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a 1 de diciembre de 2010:

Esta tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda de una beca predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (AP2005-2985) y a la financiación con cargo a fondos del grupo FQM-297 “Control analítico, Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía, procedentes de diferentes contratos, proyectos y subvenciones de la Administración central y autonómica, plan propio de investigación de la UGR, así como de empresas interesadas en los resultados de la investigación.

A mis padres

"Casi todo lo que realice será *insignificante*,
pero es muy *importante* que lo *haga*"

Mahatma Gandhi 1869-1948

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	1
OBJETO	7
RESUMEN / SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	21
1. Alimentos funcionales y sus componentes bioactivos: compuestos fenólicos	23
1.1. Dieta y salud. ¿Por qué y cómo surgen los alimentos funcionales?	23
1.2. Concepto de alimento funcional. Delimitaciones	26
1.3. Desarrollo y aplicaciones de los alimentos funcionales	29
1.4. Compuestos bioactivos de los alimentos	32
1.5. Compuestos fenólicos	33
1.5.1. Estudios relativos a los compuestos fenólicos	37
1.5.2. Importancia de la determinación de compuestos fenólicos	38
2. Estrategias para la determinación de compuestos fenólicos en matrices vegetales	41
2.1. Tratamiento de muestra	43
2.2. Polímeros de impronta molecular (MIPs)	49
2.2.1. Conceptos básicos sobre polímeros. Reacciones de polimerización	50
2.2.2. Síntesis de MIPs	51
2.2.2.1. Variables experimentales en la síntesis de MIPs	54
2.2.2.2. Metodología de polimerización	55
2.2.3. Caracterización y evaluación de MIPs	57
2.2.4. MIPs para extracciones en fase sólida	61

2.3. Técnicas separativas.....	64
2.4. Electroforesis capilar (CE).....	65
2.4.1. Definición, conceptos básicos e instrumentación	65
2.4.2. Fundamentos de la separación	68
2.4.3. Modos de separación en CE	71
2.4.3.1. Electroforesis capilar en zona (CZE)	72
2.4.4. Desarrollo de un método en CE	73
2.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	76
2.5.1. Definición y tipos de cromatografía líquida	76
2.5.2. Conceptos básicos en cromatografía	80
2.5.3. Instrumentación en HPLC	82
2.5.4. Desarrollo de un método en HPLC.....	84
2.6. Sistemas de detección	88
2.7. Absorción UV-Visible.....	89
2.8. Espectrometría de masas (MS).....	92
2.8.1. Principios e instrumentación.....	92
2.8.2. Ionización por electrospray (ESI).....	95
2.8.2.1. Acoplamiento CE-ESI-MS.....	96
2.8.2.2. Acoplamiento HPLC-ESI-MS.....	98
2.8.3. Analizadores de masas	100
2.8.3.1. Trampa de iones (IT).....	100
2.8.3.2. Tiempo de vuelo (TOF)	102
2.8.3.3. Cuadrupolo-tiempo de vuelo (Qq-TOF).....	104
2.9. Identificación y cuantificación	106
PARTE EXPERIMENTAL. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
BLOQUE TEMÁTICO I. Desarrollo de MIPs para la extracción selectiva de compuestos fenólicos.....	115
Capítulo 1. Síntesis y evaluación de un mip como material adsorbente para la extracción en fase sólida de hidroxitirosol	117
Anexo bloque I. MIPs sintetizados.....	151

BLOQUE TEMÁTICO II. Determinación de compuestos fenólicos en productos de la colmena	169
Capítulo 2. Avances en el análisis de compuestos fenólicos en productos de la colmena	171
Capítulo 3. Identificación de compuestos antioxidantes en propóleo mediante CE-ESI-MS	189
BLOQUE TEMÁTICO III. Determinación de compuestos fenólicos y otros metabolitos en tomate	203
Capítulo 4. Determinación analítica de antioxidantes en tomate: componentes típicos de la dieta mediterránea	205
Capítulo 5. Estudio del perfil metabólico y cuantificación de los compuestos fenólicos en extractos metanólicos de tomate	219
BLOQUE TEMÁTICO IV. Desarrollo de una base de datos de espectros de masas para la identificación de compuestos fenólicos	241
Capítulo 6. Identificación automática de compuestos fenólicos en alimentos usando una base de datos de espectros de masas.....	243
Anexo bloque IV. Estudio de las fragmentaciones obtenidas mediante (+)ESI-Qq-TOF de los compuestos fenólicos incluidos en la base de datos.....	255
CONCLUSIONES FINALES / FINAL CONCLUSIONS	267
OTRAS PUBLICACIONES	277
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	281

OBJETO

OBJETO

El objeto de la presente memoria es el desarrollo y evaluación de herramientas analíticas avanzadas aplicables en las distintas etapas del proceso analítico para llevar a cabo el análisis de compuestos fenólicos en alimentos funcionales.

En general, y como es bien conocido, el desarrollo práctico de cualquier proceso analítico para la determinación individual de compuestos incluye tres etapas básicas: extracción, separación analítica y detección (identificación y/o cuantificación).

En relación con la primera etapa, el objetivo planteado es el desarrollo de una fase sólida basada en polímeros de impronta molecular (MIPs) para la extracción selectiva de hidroxitirosol (HTY) de matrices complejas, concretamente del aceite de oliva. Se quiere demostrar que durante la síntesis se han creado huecos de unión específicos para el HTY y se evaluará tanto la capacidad de extracción como la selectividad de la fase sólida sintetizada.

Con respecto a la segunda etapa, se pretende poner a punto métodos sensibles, selectivos y con gran resolución utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar (CE), como técnicas de separación, acopladas a detección ultravioleta de diodo array (DAD) y a espectrometría de masas (MS) con distintos analizadores (trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF), y cuadrupolo-tiempo de vuelo (QqTOF)), como sistemas de detección. El empleo combinado de las citadas técnicas y detectores proporcionará una información más rica y complementaria. Así, la capacidad de la CE-ESI-TOF se quiere poner de manifiesto en la identificación de compuestos fenólicos en extractos de propóleo y la aplicabilidad y versatilidad del HPLC acoplado a distintos detectores (DAD, ESI-TOF-MS y ESI-IT-MS) se va a utilizar para identificar diferentes clases de metabolitos y para cuantificar los compuestos fenólicos de tres variedades de tomate.

Por último, en relación con la última etapa de identificación de compuestos, y dado que esto generalmente suele ser un trabajo muy largo y tedioso, nuestro objetivo es el de desarrollar una base de datos de espectros de masas de compuestos fenólicos utilizando

OBJETO

HPLC-ESI-QqTOF para facilitar y agilizar su identificación. Algunos de los ingredientes de origen vegetal de un complemento alimenticio se analizaran usando las mismas condiciones optimizadas en la construcción de la base de datos para poder demostrar la potencialidad de la metodología desarrollada.

**RESUMEN /
SUMMARY**

RESUMEN

Un alimento se define como funcional si posee efectos beneficiosos en una o más funciones fisiológicas del ser humano, incrementa su salud y/o disminuye el riesgo de padecer ciertas enfermedades. Normalmente la funcionalidad de un alimento está relacionada con algunos de los compuestos bioactivos que contiene. Entre ellos destacan los compuestos fenólicos, por ser en gran medida responsables de las características organolépticas de los alimentos procedentes de las plantas y, además, porque la ingesta de alimentos que los contienen está asociada con efectos beneficiosos, exhibiendo un amplio rango de propiedades fisiológicas. Por tanto, un conocimiento detallado de estos compuestos en los alimentos contribuirá, por un lado, a la caracterización del producto alimenticio que lo contiene, y por otro, a entender mejor sus efectos sobre la salud. En muchas ocasiones se trata de componentes en concentraciones muy pequeñas, por lo que son necesarias técnicas analíticas sensibles, selectivas y con gran capacidad de resolución.

La presente memoria de tesis doctoral, titulada “Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales”, trata sobre el desarrollo y la evaluación de metodologías de utilidad en las distintas etapas del proceso analítico para llevar a cabo la determinación de dichos compuestos minoritarios de interés en matrices alimenticias. La memoria se ha dividido en dos secciones principales: introducción y sección experimental, que incluye los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

En la introducción se describen las características y propiedades más destacadas de los alimentos funcionales y los compuestos bioactivos, y más concretamente, de los compuestos fenólicos, así como las técnicas que se utilizan para su determinación, haciendo especial hincapié en las herramientas analíticas desarrolladas y evaluadas: síntesis de polímeros de impronta molecular (MIPs), técnicas separativas (HPLC y CE) y sistemas de detección (DAD y MS).

La parte experimental consta de cuatro bloques temáticos, relacionados con las estrategias que se han empleado en las distintas etapas del proceso analítico (extracción, separación y detección).

El bloque temático I versa sobre el desarrollo de MIPs para la extracción selectiva de compuestos fenólicos; en el único capítulo que incluye este bloque (capítulo 1), se describe la síntesis y caracterización de un MIP como fase adsorbente selectiva para hidroxitirosol (HTY) en extracciones en fase sólida (SPE). El MIP se sintetizó mediante una polimerización radicalaria en disolución, usando HTY como molécula molde y, a la vez que el MIP, se sintetizó el correspondiente NIP (polímero no impreso de control, sintetizado en las mismas condiciones pero en ausencia de molécula molde), necesario para demostrar el efecto de impronta y determinar la selectividad del MIP. La caracterización de los sitios de unión del MIP se llevó a cabo mediante estudios de distribución de afinidad. Para ello, se realizaron experimentos en “*batch*” utilizando dos disolventes de distinta polaridad y los datos experimentales se ajustaron al modelo de isoterma de adsorción de Freundlich, a partir del cual se calcularon las constantes de afinidad y la densidad de los sitios de unión. Posteriormente, se evaluó la selectividad del MIP hacia la molécula molde mediante un proceso de SPE, utilizando ocho compuestos fenólicos relacionados estructuralmente con el HTY, y cuatro disolventes de distinta polaridad para realizar las etapas de carga y de lavado. Ambos estudios permitieron demostrar la existencia del efecto de impronta. Finalmente, se compararon las capacidades de extracción del MIP y de un cartucho Diol comercial, siendo el primero capaz de retener mayores cantidades tanto de hidroxitirosol y de tirosol. Al final del bloque I se incluye un anexo con todos los polímeros sintetizados empleando diferentes técnicas de polimerización y condiciones de síntesis, y utilizando otras moléculas molde (catecol, tirosol, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico). La parte de desarrollo y síntesis de los polímeros se llevó a cabo en el Departamento de Química Pura y Aplicada de la Universidad de Strathclyde de Glasgow (Reino Unido) mientras que su evaluación fue realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

En los dos siguientes bloques temáticos se describe la aplicación de métodos analíticos avanzados para la caracterización de compuestos bioactivos en distintas matrices: el bloque II se centra en la identificación de compuestos fenólicos en propóleo mediante CE-ESI-MS, mientras que el bloque III lo hace en la identificación de distintas clases de metabolitos y la cuantificación de compuestos fenólicos en tomate mediante HPLC-DAD-ESI-MS.

El bloque temático II consta de dos capítulos. En el primero de ellos (capítulo 2) se recogen y resumen los métodos analíticos publicados hasta 2006 para la determinación de compuestos fenólicos en dos productos procedentes de la colmena, el propóleo y la miel. La calidad y las propiedades de dichos productos van a depender de su composición química, que a su vez depende del clima y del origen geográfico y floral de la zona donde las abejas realizan la recolección; de hecho, ciertos compuestos fenólicos podrían usarse como marcadores del origen floral de ambos productos. El tercer capítulo describe la optimización de un método CZE-ESI-MS para el análisis de compuestos fenólicos en extractos de propóleo; se estudiaron tanto los parámetros que afectan a la separación electroforética como los que afectan a la intensidad de la señal MS. El uso de un analizador de masas TOF permitió la identificación de doce flavonoides comparando las fórmulas moleculares obtenidas a partir de los datos de masa exacta con los datos en bibliografía. Los compuestos identificados presentan actividad biológica y, por tanto, se pueden considerar responsables en parte de las propiedades beneficiosas del propóleo sobre la salud.

Siguiendo la sistemática anterior, el bloque temático III se ha dividido en dos capítulos. Así, el capítulo 4 recoge una revisión bibliográfica de los trabajos publicados entre 2000 y 2007 relativos al análisis de los compuestos antioxidantes presentes en tomate (carotenoides, vitaminas y compuestos fenólicos). La elección del método de análisis depende del objetivo del estudio y de los compuestos analizados, siendo HPLC la técnica más utilizada en el análisis de antioxidantes en tomate. En el quinto capítulo se emplea la HPLC como técnica separativa acoplada a distintos detectores, DAD y ESI-MS (con dos analizadores de masas diferentes, IT y TOF), para llevar a cabo la identificación de los metabolitos presentes en el extracto metanólico de tres variedades de tomate, Daniela, Rambo y Raf. Combinando la información obtenida mediante los diferentes detectores (tiempo de retención, espectros de absorbancia UV-vis, masa exacta, distribución isotópica y patrón de fragmentación, en polaridades negativa y positiva) y utilizando la bibliografía y las bases de datos existentes, se pudieron identificar tentativamente un total de 135 metabolitos pertenecientes a distintas familias de compuestos: aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, compuestos fenólicos, triterpenoides y ácidos grasos, 21 de los cuales, de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, no se habían identificado antes en el fruto del tomate. De todos ellos, los metabolitos más abundantes en el extracto fueron los compuestos fenólicos (61 en total), incluyendo alcoholes fenólicos, ácidos hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos, fenilacéticos y flavonoides. El método, utilizando ESI-TOF en polaridad negativa, fue validado y empleado en la cuantificación de la fracción fenólica de las tres variedades; al no existir estándares comerciales para la mayoría de los compuestos identificados, se usaron como patrones compuestos pertenecientes a la misma familia. Se

hizo así una estimación de la abundancia de cada compuesto y familia en las distintas variedades, destacando en todas ellas los ácidos hidroxicinámicos (30 identificados, siendo los más abundantes el ácido cafeoilquínico con sus distintos isómeros); con respecto a los flavonoides, la mayoría pertenece a la familia de los flavonoles (en concreto, derivados de la quercetina). Los mayores niveles de compuestos fenólicos se detectaron en la variedad Daniela.

El último bloque temático consta de un capítulo en el que se aborda la construcción de una base de datos de espectros de masas (MS) y masas/masas (MS/MS) de compuestos fenólicos mediante HPLC-ESI-QqTOF para la detección automática e identificación robusta de dichos compuestos, facilitando y agilizando así esta última etapa del proceso analítico, que puede resultar un trabajo largo y tedioso. El analizador Q-TOF proporciona exactitud de masa y distribución isotópica verdadera tanto en el espectro MS como en el de MS/MS, siendo una herramienta muy adecuada para la identificación y elucidación estructural de compuestos. Para demostrar la potencialidad del método automático desarrollado se analizaron algunos de los ingredientes de origen vegetal de un complemento alimenticio (propóleo, cebolla, ajo o limón, entre otros). A pesar del limitado número de compuestos introducidos en la base de datos (un total de 39) pudieron identificarse con éxito diversos compuestos en los extractos estudiados. Este sexto capítulo también contiene un estudio relativo a los patrones de fragmentación en polaridad negativa de los compuestos fenólicos incluidos en la base de datos. La discusión acerca de los patrones de fragmentación en polaridad positiva se recoge en un anexo, ya que debido a su extensión, no se incluyeron en el trabajo publicado. El estudio de las fragmentaciones facilitará la identificación de compuestos desconocidos que no se hayan incorporado a la base de datos. El trabajo experimental de este bloque fue realizado durante una estancia en la empresa Bruker Daltonik GMBH en Bremen, Alemania.

SUMMARY

Food can be regarded as functional if it is satisfactorily demonstrated to beneficially affect one or more target functions in the body, beyond adequate nutritional effects, in a way which is relevant to either an improved state of health and well-being, or reduction of risk of disease. The functionality of a food is though to be related to the presence of a wide range of compounds belonging to the bioactive substances group. Amongst them, phenolic compounds are of great importance, and are considered to be partly responsible for the major organoleptic characteristics of plant-derived food and beverages. In addition, consumption of phenolic compounds has been associated with positive health benefits, showing a wide range of physiological properties. Detailed knowledge of the phenolics consumed will contribute to a better understanding of their influence on biological properties. In many instances, these compounds are in very low concentrations; therefore sensitive methods need to be established for their determination.

This doctoral thesis, entitled “Development and evaluation of analytical strategies for the characterisation of bioactive compounds in functional foods”, concerns the development and assessment of suitable strategies for the different stages of the analytical process for screening and identifying phenolic compounds in plant-derived foods. The thesis report has been divided into two main parts: introduction and experimental, the later includes the obtained results and their discussion.

The introduction describes the characteristics and properties of functional foods and bioactive compounds, paying especial attention to phenolic compounds. The second half of the introduction includes a summary of the techniques used for the determination of phenolic compounds in plant-derived foods, as well as information concerning the analytical strategies developed: molecularly imprinted polymers (MIPs) synthesis, separation techniques (HPLC and CE) and detection systems (DAD and MS).

The experimental part is divided into four sections, related to the different strategies that have been employed in the different stages of the analytical process for the individual identification of compounds (extraction, separation and detection).

In the first section, the development of MIPs for the selective extraction of phenolic compounds is described; chapter 1 presents the synthesis of a MIP and its evaluation as sorbent for the solid-phase extraction (SPE) of hydroxytyrosol (HTY). The polymer monolith was prepared by radical polymerisation using HTY as the template. A non-imprinted polymer (NIP) was prepared in parallel and under identical conditions but in the absence of the template. It is used as control polymer to demonstrate the imprinting effect and determine the selectivity of the imprinted polymer. Affinity distribution analyses were used to characterise the binding sites on the MIP. With this purpose, batch rebinding experiments were carried out using two solvents of different polarity and the obtained experimental data were modelled with the Freundlich adsorption isotherm equation, which allowed the calculation of the number of binding sites and the weighted average affinity. Subsequently the polymer was packed in a cartridge for its evaluation as sorbent phase in SPE, and its selectivity was evaluated towards eight structurally related compounds of HTY by means of a MISPE procedure solvents with different polarities in the loading and washing steps. Results from both studies confirmed the imprinting effect. Finally, the binding capacities of the MIP and a commercial sorbent material (Diol) were compared. The imprinted polymer enabled the extraction of higher amounts of hydroxytyrosol and tyrosol under the same extraction conditions. This section also includes an annex summarising all the polymers that were synthesised using different polymerisation techniques, conditions or templates (catechol, tyrosol, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid). The polymer synthesis and development was carried out in the Pure and Applied Chemistry Department of the University of Strathclyde (UK), after which the evaluation was undertaken in the Analytical Chemistry Department of the University of Granada.

Sections II and III describe the development and application of advanced analytical methods for the characterisation of bioactive compounds in different plant-derived matrices. In section II, a method for the identification of phenolic compounds from propolis using CE-ESI-MS is presented. Section III is focused on tomato, describing the identification of metabolites and the quantification of phenolic compounds by means of HPLC-DAD-ESI-MS.

Section II is divided into two chapters. The first (chapter 2) includes an overview of the analytical methods published up to 2006 for the determination of phenolic compounds in two bee-derived products, propolis and honey. The quality and properties of these products depends on its chemical composition, which is strongly affected by the floral, geographical

origin and climatic characteristic of the collection site. Phenolic compounds can be used as floral origin markers of propolis and honey. The second (chapter 3), presents the optimisation of a CZE-ESI-MS method for the analysis of phenolic compounds in propolis extracts; several electrophoretic parameters as well as the parameters affecting the intensity of the MS signal were studied. Twelve flavonoids were identified by comparing the generated molecular formula (obtained from the accurate mass and isotopic pattern provided by the TOF analyser) with the bibliographic data. The identified compounds show biological activity and might be responsible of the beneficial effects of propolis on health.

Similarly, section III is divided into two chapters. In the first (chapter 4), the papers published between 2000 and 2007 on the determination of antioxidant compounds in tomato (carotenoids, vitamins and phenolic compounds) are reviewed. The selection of analytical methods depends on the aim of the analysis and the kind of compounds studied, HPLC being the technique of choice for analysis of tomato antioxidants. Chapter 5 covers the comprehensive profiling of semi-polar metabolites in the methanol extract of three cultivars of raw tomatoes (Daniela, Raf and Rambo), using HPLC as separation technique coupled to several detectors: DAD and ESI-MS with two different mass analysers, IT and TOF. Metabolite assignments were made by comparing retention time, UV/Vis spectra and MS data (accurate mass, isotopic distribution and fragmentation pattern, in both negative and positive ion modes) of the compounds detected with the tomato compounds reported in literature and searching in the existing on-line public databases. In this way 135 compounds belonging to various structural classes (organic acids, amino acids, nucleosides, phenolic compounds, triterpenoids and fatty acids) were tentatively identified, 21 of which are, to our knowledge, reported for the first time in the tomato fruit. Among the different classes of metabolite found, the most abundant were phenolic compounds (61 were identified in total, including phenolic alcohols, hydroxybenzoic, hydroxycinnamic and phenylacetic acids and flavonoids). The method, using ESI-MS in negative ion mode, was validated and employed for the quantitative analysis of phenolics. Since standards were not commercially available, an external standard of the same phenolic family was used in the quantification. In this way, quantitative estimates in terms of individual compounds and phenolic families could be done. In all the tomato cultivars, hydroxycinnamic acids and their derivatives were the main phenolic compounds (a total of 30 compounds identified, being caffeoylquinic acid and its isomers the most abundant). Concerning flavonoids, flavonols was the most abundant family, in special quercetin derivatives. The highest levels of phenolic compounds were detected in the Daniela cultivar.

Section IV, the last section (with chapter 6), presents the development of a method based on a library search for the automated and robust identification of phenolic compounds. For that purpose, a library of phenolic compounds using retention time, MS and MS/MS spectra was built up by means of HPLC interfaced to an ESI-Qq-TOF mass spectrometer, which provides mass accuracy and true isotopic pattern in MS and MS/MS and has proved to be a very useful tool in the identification and structural elucidation of compounds. Building up a library under standardised conditions, facilitates and speeds up the identification of any compound. The applicability of the automated method was demonstrated by analysing some of the ingredients of a dietary supplement. These ingredients were mostly freeze-dried concentrates from vegetables such as lemon, onion and garlic, and propolis. In spite of the limited number of phenolic compounds included in the library (39), a number of them were successfully identified in the extracts. Within this chapter, a detailed discussion about the fragmentation patterns in the negative mode of the phenolic compounds included in the library is also presented. The discussion about the fragmentation patterns in the positive ion mode are described in the annex. This fragmentation study may facilitate the identification of unknown phenolic compounds not included in the library. The experimental work presented in this section was carried out at the company Bruker Daltonik GMBH in Bremen, Germany.

INTRODUCCIÓN

1. ALIMENTOS FUNCIONALES Y SUS COMPONENTES BIOACTIVOS: COMPUESTOS FENÓLICOS

“El hombre primero quiso comer para sobrevivir, luego quiso comer bien e incorporó la gastronomía a su mundo cultural. Ahora, además, quiere comer salud”

F. Grande Covián

Fundador y primer presidente de la Sociedad Española de Nutrición

1.1 Dieta y salud. ¿Por qué y cómo surgen los alimentos funcionales?

Durante los últimos años la percepción que la industria y el consumidor tenían de los alimentos se ha modificado sustancialmente. La “*nutrición adecuada*”, entendida como suficiente y dirigida a evitar déficits, ha dejado de ser la meta en las sociedades desarrolladas. Emerge la concepción de la alimentación como “*nutrición óptima*”, es decir, aquella que no sólo aporta las necesidades energéticas y nutricionales básicas, sino que también proporciona beneficios fisiológicos adicionales. La nutrición adquiere un nuevo enfoque terapéutico y preventivo, participando en la promoción de la salud. El reto del futuro es la “*nutrición a la carta*”, diseñada a medida de los factores genéticos y medioambientales que constituyen y moldean al ser humano¹.

A este cambio de actitud frente a la alimentación han contribuido enormemente los siguientes factores^{2,3}:

¹ Silveira-Rodríguez, M.B., Monereo-Megías, S., Molina-Baena, B., *Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos?*, Rev. Esp. Salud Pública 2003, 77, 317-331.

² López-Nicolás, J.M., *Nuevos alimentos para el siglo XXI*, Universidad Católica San Antonio, Murcia, 2004.

³ Mínguez-Mosquera, M.I., Pérez Gálvez, A., *Características químicas nutricionales y funcionales de los alimentos*, CTC Alimentación 2005, 24, 11-20.

- Creciente interés por el binomio alimento/salud debido a los estudios que demuestran que una dieta sana y equilibrada puede prevenir la aparición de ciertas enfermedades crónicas. El ritmo de vida actual y la falta de tiempo para cocinar han provocado que muchas personas abandonen determinados hábitos de alimentación saludables y, por tanto, que no ingieran todos los nutrientes que necesitan o las cantidades adecuadas. Esto ha generado un mayor interés por conocer los ingredientes que componen los alimentos y la energía que aportan (creciente relevancia del etiquetado nutricional) sobre todo para personas con obesidad, con colesterol, diabéticos, celíacos, etc.
- Desarrollo de nuevas tecnologías que posibilitan el diseño y la elaboración de nuevos productos alimentarios seguros y saludables. En los últimos años, la Industria Alimentaria se ha esforzado en buscar nuevos alimentos por dos motivos principales: aumentar el rendimiento o bien lograr alimentos con un valor añadido para el consumidor.
- Aumento paulatino de la esperanza de vida con el consiguiente envejecimiento de la población mundial. Este hecho por sí mismo es suficiente para modificar el concepto y tipo de alimentación ya que, aunque la tercera edad requiere una menor contribución energética, necesita mantener su ingesta en nutrientes y demanda alimentos con mayor contenido nutricional y de mayor digestibilidad. Este factor se concatena con los dos siguientes.
- Aumento en el nivel de dependencia de esa población, por el desarrollo de enfermedades crónicas de carácter neurodegenerativo y por otras enfermedades como hipertensión arterial, osteoporosis, diabetes, enfermedades cardiovasculares o relacionadas con la edad y la malnutrición, que también están relacionadas con la dieta.
- Aumento de los costes sanitarios que representan actualmente entre el 20% y el 30% del presupuesto total en los países Occidentales, siendo las personas mayores de 60 años las que más costes generan.

En este contexto surgen los **alimentos funcionales**. El concepto de alimento funcional como tal surgió en Japón a principio de los 80, aunque en la cultura asiática siempre ha existido la creencia de que medicina y alimento provienen de la misma fuente y sirven a un mismo propósito⁴. Debido al incremento gradual de ciertas enfermedades relacionadas con el estilo de vida, la población empezó a darse cuenta de la importancia de

⁴ Verschuren, P.M., *Functional foods: scientific and global perspectives*, Br. J. Nutr. 2002, 88, 125-130.

mantener y mejorar su salud⁵ y el gobierno tomó conciencia de los costes sanitarios generados por la mayor esperanza de vida de la población anciana. En 1991, el Ministerio de Salud y Bienestar de este país fue pionero en publicar una reglamentación permitiendo legalmente la comercialización de algunos alimentos funcionales en términos de “alimentos para uso específico en la salud” (*Foods for specified health uses* o FOSHU), refiriéndose a aquellos alimentos con componentes que desempeñan una función favorable y específica en las funciones fisiológicas del organismo humano más allá de su aporte nutricional. Para su aprobación como FOSHU, un alimento debe cumplir fundamentalmente tres requisitos^{6,7}:

- que exista evidencia científica de su eficacia, incluyendo estudios clínicos,
- que su consumo sea seguro, con estudios adicionales en humanos,
- y que se hayan determinado analíticamente sus compuestos bioactivos.

En 2001, el gobierno japonés amplió el rango de los FOSHU añadiendo los complementos alimenticios en forma de cápsulas y comprimidos a los alimentos tradicionales. También estableció una nueva legislación acerca de los “alimentos con alegaciones sanitarias” (*Foods with health claims*), los cuales incluyen los existentes FOSHU y los nuevos “alimentos con alegaciones nutricionales” (*Foods with nutrient function claims* o FNFC). Como FNFC se han homologado doce vitaminas (vitaminas A, B1, B2, B6, B12, C, E, D, biotina, niacina y ácidos pantoténico y fólico) y dos minerales (hierro y calcio)⁷.

El abordaje científico de la alimentación funcional en Europa tiene su punto de partida en un grupo de trabajo promovido por la Sección Europea del *International Life Sciences Institute* (ILSI). El proyecto se tituló *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) y su objetivo era proponer una serie de conceptos y definiciones de consenso (qué es un alimento funcional, descubrimiento y desarrollo de nuevos alimentos funcionales, consolidación de las alegaciones sanitarias o *health claims*) con el fin de proporcionar bases y fundamentos apropiados para el futuro desarrollo científico de la alimentación funcional^{8,9}. En abril de 1996 se celebró en Francia la primera reunión plenaria en la que se discutió el estado de la ciencia de los alimentos funcionales y se establecieron sus diferentes áreas de

⁵ Ohama, H., Ikeda, H., Moriyama, H., *Health foods and foods with health claims in Japan*, Toxicology 2006, 221, 95-111.

⁶ Arai, S., Osawa, T., Ohigashi, H., Yoshikawa, M., Kaminogawa, S., Watanabe, M., Ogawa, T., Okubo, K., Watanabe, S., Nishino, H., Shinohara, K., Esashi, T., Hirahara, T., *A mainstay of functional foods science in Japan - History, present status, and future outlook*, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001, 65, 1-13.

⁷ Shimizu, T., *Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison*, Nutr. Res. Rev. 2003, 16, 241-252.

⁸ Roberfroid, M.B., *Global view on functional foods: European perspectives*, Br. J. Nutr. 2002, 88, S133-S138.

⁹ Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. Alimentos funcionales. Madrid: Rumagraf, 2005. <http://www.fecyt.es/fecyt/docs/tmp/601479851.pdf>

aplicación. La segunda reunión plenaria tuvo lugar en julio de 1997 en Helsinki y la tercera en Madrid, a finales de 1998.

El primer documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales fue elaborado en 1999¹⁰. Hoy día se sigue investigando para definir y obtener un mayor conocimiento acerca de los alimentos funcionales, sus propiedades y efectos sobre las funciones fisiológicas del cuerpo humano.

1.2 Concepto de alimento funcional. Delimitaciones

Como ya se ha comentado, el término alimento funcional fue acuñado en Japón y posteriormente se extendió por todo el mundo. No existe una definición universalmente aceptada ya que los alimentos funcionales son más un concepto que un grupo de productos bien definido¹ y sus limitaciones son distintas según la zona⁴. Las discrepancias existentes entre los países se deben principalmente a las diferencias culturales, las situaciones de mercado o la diferente manera de entender la nutrición¹¹. Así, por ejemplo, para definir un alimento como funcional en Estados Unidos, éste debe haber sido modificado de alguna forma, mientras que en Japón unas cápsulas o píldoras pueden considerarse alimentos funcionales. A continuación nos centraremos en la delimitación europea, por ser la que afecta a nuestro país.

En 1999, el grupo de expertos coordinado por el ILSI definió alimento funcional como “aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable. Los alimentos funcionales no dejan de ser alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades que se consideren normales para su consumo en la dieta: no se trata de pastillas o píldoras, sino que forman parte de los hábitos alimenticios normales. Un alimento funcional puede ser un alimento natural o un alimento en el que un componente haya sido añadido/retirado tecnológicamente o biotecnológicamente. También puede ser un alimento en el que la naturaleza o la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes haya sido modificada, o cualquier combinación de estas posibilidades. Un alimento funcional

¹⁰ Diplock, A. T., Aggett, P. J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E. B., Roberfroid, M. B., *Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document*, Br. J. Nutr. 1999, 81, S1-S27.

¹¹ Kwak, N.S., Jukes, D.J., *Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept*, Food Control 2001, 12, 99-107.

puede serlo para todos los miembros de una población o para un grupo específico, que puede estar definido, por ejemplo, por su edad o constitución genética¹⁰.

No se trata de una definición cerrada y definitiva sino más bien una forma de describir y delimitar convenientemente el concepto de modo que permita trabajar científicamente sobre una base precisa. Aspectos importantes a destacar^{8,8}:

- a) El efecto funcional es distinto que el nutritivo.
- b) Debe demostrarse satisfactoriamente. Por sí solas las transformaciones en los alimentos no confieren necesariamente el carácter de funcional, sino que ese efecto debe demostrarse expresamente en cada caso.
- c) Puede consistir en mejoría de funciones fisiológicas (incluyendo funciones psicológicas como el bienestar) o en reducción del riesgo de desarrollar una determinada enfermedad.
- d) Se trata de un alimento, no de una píldora o cápsula, y debe consumirse como parte de la dieta normal.

El concepto de alimento funcional tal y como lo define el ILSI está bastante aceptado; aún así, la industria y los investigadores usan términos similares para centrar el interés en las características de su propio producto. Además, existen una serie de términos legales cuyo ámbito se superpone con el de los alimentos funcionales. Entre estos términos se encuentran los alimentos para usos dietéticos específicos, medicinales, enriquecidos, saludables, nuevos, nutracéuticos y complementos alimenticios^{12,13}. Para poder clarificar sus similitudes y diferencias, en la **figura 1** se representa la relación que existe entre varios de los citados términos teniendo en cuenta cinco factores: la propia naturaleza del alimento, el efecto esperado sobre la salud, la forma en que se encuentra, a quien va dirigido y su procesado.

¹² Kwak, N.S., Jukes, D.J., *Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology*, Food Control 2001, 12, 99-107.

¹³ Arvanitoyannis, I.S., Houwelingen-Koukaliaroglou, M.V., *Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation*, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2005, 45, 385-404.

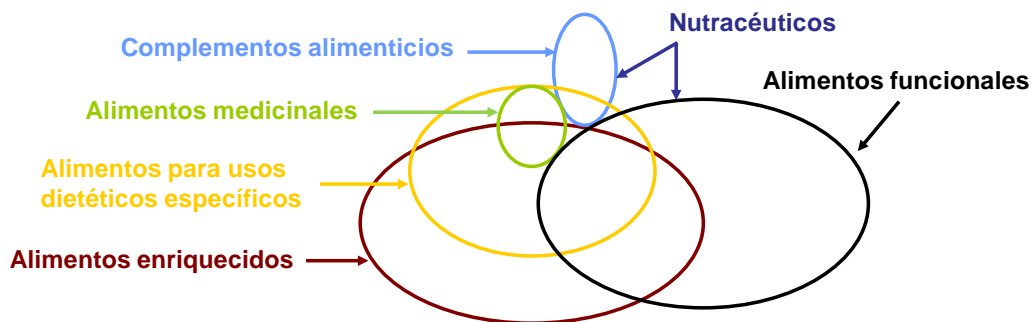


Figura 1. Relación entre algunos de los términos referentes a alimentos que mejoran la salud¹²

- ❖ **Alimentos para usos dietéticos específicos.** Término que se refiere a alimentos que no forman parte de la dieta normal y que cumplen dos características principales: **i)** son consumidos por un grupo específico de la población debido a un estado físico o fisiológico y/o a una enfermedad o desorden determinados, **ii)** su composición debe diferir significativamente de un alimento tradicional. Se superponen con los alimentos funcionales si han sido específicamente formulados y/o proporcionan beneficios sobre la salud a una cierta población más allá de sus valores nutricionales normales.
- ❖ **Alimentos medicinales.** Alimentos que se han formulado o procesado para usos dietéticos específicos de pacientes y deben ser usados sólo bajo supervisión médica. Se distinguen claramente de los alimentos funcionales ya que a ellos sí se le permiten alegaciones sanitarias referidas a una enfermedad o desorden específicos.
- ❖ **Alimentos enriquecidos o fortificados.** Pueden considerarse como alimentos funcionales si los nutrientes esenciales son añadidos en los alimentos tradicionales con el objetivo de proporcionar beneficios sobre la salud más allá de sus valores nutricionales normales.
- ❖ **Alimentos saludables.** Pueden definirse brevemente como alimentos con reconocidas propiedades saludables y engloba a los alimentos *naturales* (sin aditivos artificiales o muy poco procesados), *ecológicos* (cultivados en suelos orgánicos sin usar ningún tipo de sustancias agroquímicas) o *dietéticos* (alimentos nutritivos como las bebidas para deportistas). De este modo, los alimentos funcionales son un tipo de alimentos saludables.
- ❖ **Nuevos alimentos.** Aquéllos que reúnan al menos una de las siguientes características:
 - son transgénicos o proceden de microorganismos modificados genéticamente,
 - poseen una estructura molecular distinta a la que presentaban con anterioridad,

- proceden de microorganismos, algas u hongos (distintos los empleados tradicionalmente en la elaboración de alimentos) o de animales o vegetales en cuya reproducción se emplean métodos no tradicionales,
- se han obtenido mediante nuevos procesos de producción que ocasionan modificaciones importantes de su composición o estructura tales que afecten su valor nutricional, su asimilación por el organismo o la cantidad de sustancias no deseables que contienen.

Cuando un alimento funcional sufre cambios sustanciales en comparación con el equivalente alimento tradicional, se le considera nuevo alimento.

- ❖ **Nutracéuticos.** Término típico de las industrias farmacéutica y médica que se refiere a los alimentos o parte de los mismos que proporcionan beneficios para la salud incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades. Este término engloba tanto a los complementos alimenticios como a los alimentos funcionales.
- ❖ **Complementos alimenticios.** Se denomina complementos alimenticios a “aquellos productos cuyo fin sea complementar la dieta normal, consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada [...] y que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias”¹⁴. Se distinguen claramente de los alimentos funcionales ya que son complementos de la alimentación y no sustitutivos de ésta, siendo en la forma más parecidos a los medicamentos que a los alimentos tradicionales.

1.3 Desarrollo y aplicaciones de los alimentos funcionales

Como acabamos de poner de manifiesto, un alimento funcional puede ser un alimento tradicional, y también uno elaborado a partir de un alimento tradicional mediante^{8,15}:

1. Eliminación de un componente conocido que causa un efecto perjudicial cuando se consume (ej. proteína alergénica).

¹⁴ Real Decreto 1487/2009, de 26 de septiembre, relativo a los complementos alimenticios, <http://www.boe.es/boe/dias/2009/10/09/pdfs/BOE-A-2009-16109.pdf>

¹⁵ Marti del Moral, A.A., Martínez-Hernández, J.A., *¿Sabemos realmente que comemos?: alimentos transgénicos, ecológicos y funcionales*, ENUSA, Barañain, Navarra, 2005.

2. Aumento de la concentración (enriquecimiento) de un componente presente de forma natural en el alimento hasta un nivel en el que se produzca el efecto beneficioso deseado (ej. la leche con calcio).
3. Adición de un componente (fortificación) que el alimento previamente no contenía con efectos fisiológicos beneficiosos (ej. productos lácteos con prebióticos).
4. Sustitución parcial de un ingrediente, usualmente un macronutriente cuya ingesta es normalmente alta y puede tener un efecto negativo, por otro con efectos fisiológicos beneficiosos (ej. leche entera por desnatada con vitaminas A, D, y E).
5. Aumento de la biodisponibilidad o estabilidad de un componente que produzca un efecto beneficioso o que reduzca el riesgo de padecer una enfermedad (ej. la biodisponibilidad del licopeno mejora calentando las preparaciones de tomate en presencia de aceite).
6. Cualquier combinación de las anteriores.

Hasta el momento, los objetivos y funciones a los que se está dirigiendo y aplicando el estudio de los alimentos funcionales son^{8,15}:

- ✓ **Desarrollo fetal y crecimiento.** En estos períodos, las necesidades energéticas y de determinados nutrientes son más elevadas que en otras etapas de la vida y tanto la dieta de la madre como la del propio niño pueden influir en su desarrollo y crecimiento. En este grupo encontramos alimentos enriquecidos con hierro, ácido fólico en cereales de desayuno, yodo en sal, calcio y vitamina D en lácteos, nutrientes específicos para la infancia en fórmulas infantiles, etc.
- ✓ **Funciones gastrointestinales.** El equilibrio de la microflora intestinal es importante a la hora de mantener una buena salud y prevenir enfermedades^{16,17}, ya que entre sus funciones se incluyen el efecto barrera o resistencia a la colonización de microorganismos potencialmente patógenos, funciones de nutrición y metabolismo y funciones tróficas sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal y sobre el desarrollo y la modulación del sistema inmunológico. Esta categoría engloba los alimentos probióticos, prebióticos, simbióticos y los ricos en fibra, pues pueden ejercer efectos beneficiosos en patologías del tracto gastrointestinal como diarreas, intolerancia a la lactosa, cáncer de colon y enfermedades intestinales crónicas, entre otras.

¹⁶ Serrano-Ríos, M., Sastre-Gallego, A., Cobo-Sanz, J.M., *Tendencias en alimentación funcional: temas seleccionados*, You&Us, Madrid, 2005.

¹⁷ Guarner, F., *Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad*, Nutr. Hosp. 2007, 22, 14-19.

- ✓ **Metabolismo de macronutrientes.** Esta función se refiere al metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos y, más concretamente, a la regulación hormonal de su metabolismo. El objetivo de este proceso es la reducción del riesgo de padecer los efectos patológicos asociados con el síndrome de resistencia a la insulina (obesidad, hipertensión arterial, diabetes, colesterol), que son el prelude de una enfermedad cardiovascular. Algunos ejemplos son los alimentos de bajo contenido energético, enriquecidos en omega-3, grasas monoinsaturadas o fibra, etc.
- ✓ **Metabolismo xenobiótico.** Actualmente se designa xenobióticos a los compuestos, tanto naturales como sintéticos, a los que estamos expuestos (forman parte de pinturas, plásticos, cigarrillos, cosméticos, medicamentos, etc.) y que nuestro organismo metaboliza y acumula, pudiendo tener efectos negativos para la salud. El organismo puede realizar su modulación mediante compuestos no-nutritivos de los alimentos. Por ejemplo, la actividad de la enzima CYP3A4, involucrada en el metabolismo de muchas drogas como la ciclosporina o felodipina, es muy sensible a la modulación por componentes del vino, del zumo de pomelo o del ajo¹⁸.
- ✓ **Funciones psicológicas, intelectuales y de comportamiento** (apetito o sensación de saciedad, rendimiento cognitivo, humor, manejo del estrés,...). En este área se podrían incluir los alimentos ricos en fibra (alto valor de saciedad), con sustancias excitantes (cafeína, ginseng) o tranquilizantes (melisa) extraídas de plantas, etc. Aún así, aparecen muchas cuestiones acerca del efecto de los alimentos sobre dichas funciones y sobre la metodología empleada para su estudio ya que se percibe como no adecuada para generar datos cuantitativos sólidos para un análisis estadístico.
- ✓ **Sistemas redox y antioxidante.** Los mecanismos que involucran la aparición de radicales libres están implicados en ciertas etapas del desarrollo de diversas enfermedades (cardiovasculares, degenerativas e incluso cáncer). Los estudios epidemiológicos son incompletos pero en general apoyan la hipótesis de que una ingesta adecuada y equilibrada de alimentos ricos en antioxidantes contribuye a proteger a las células y tejidos de nuestro cuerpo del efecto nocivo de los radicales libres y, por tanto, a reducir el riesgo de padecer ciertas patologías¹⁹. Destacaremos las vitaminas E (frutos secos, germen de trigo) y C (cítricos, kiwi), carotenoides (licopeno en tomate, β -caroteno en zanahorias), zinc y selenio (carnes, pescados, huevos), compuestos de azufre (col, cebolla, ajo) y flavonoides y otros polifenoles

¹⁸ Harris, R.Z., Jang, G.R., Tsunoda, S., *Dietary effects on drug metabolism and transport*, Clinical Pharmacokinetics 2003, 42, 1071-1088.

¹⁹ Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J., *Functional food science and defence against reactive oxidative*, Br. J. Nutr. 1998, 80, S77-S112.

(vegetales en general). En los últimos años ha sido muy significativo el aumento de productos enriquecidos con sustancias antioxidantes.

1.4 Compuestos bioactivos de los alimentos

Los nutrientes que proporcionan los alimentos son de dos tipos: *macronutrientes*, que se requieren en mayor proporción (proteínas, carbohidratos y lípidos), y *micronutrientes*, que, aunque se necesitan en menor cantidad, son fundamentales para el organismo por intervenir en funciones vitales (vitaminas, minerales, ácidos grasos y aminoácidos esenciales)²⁰. No obstante, la funcionalidad de un alimento está generalmente relacionada con alguno de los componentes “no nutrientes” que contiene, los *compuestos bioactivos* (también llamados *fitoquímicos* cuando se trata de compuestos de origen vegetal), cuya presencia y concentración va a estar en función de diversos factores (climatológicos, agronómicos, tecnológicos o culinarios, entre otros).

A pesar de no tener una función nutricional clásicamente definida, o no considerarse esenciales para la salud humana, los compuestos bioactivos poseen cierta actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en bienestar para el individuo y menor riesgo de padecer determinadas enfermedades, y son los que le confieren al alimento aquellas características específicas que lo convierten en funcional.

Ha sido en las últimas décadas cuando los investigadores han comenzado a identificar de forma aislada los componentes que hacen que un alimento sea funcional y a determinar los beneficios concretos que éstos proporcionan a nuestro organismo. Los consumidores prefieren que dichos componentes tengan un origen natural en vez de sintético, por lo que normalmente se extraen de plantas, de subproductos del procesado de alimentos o incluso de algas.

Los ingredientes funcionales pueden clasificarse según su naturaleza química, como se recoge en la **figura 2**, donde se muestran algunos ejemplos de compuestos bioactivos. De entre todos ellos nos centraremos en los compuestos fenólicos, ya que el objeto principal de la tesis ha sido su estudio en diferentes matrices alimentarias de origen vegetal.

²⁰ Cámara-Hurtado M., Sánchez-Mata, M.C., Torija-Isasa, M.E., *Frutas y verduras, fuentes de salud*, Colección Nutrición y salud, Grupo Elba, Madrid, 2003. http://www.senba.es/recursos/pdf/frutas_y_verduras.pdf

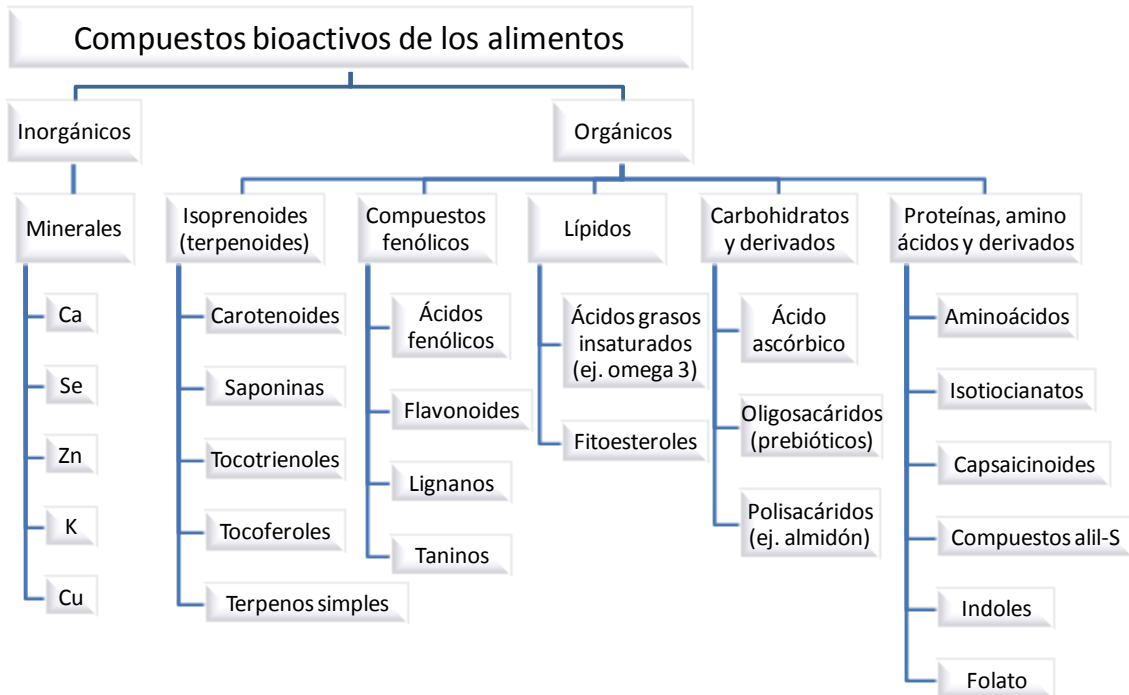


Figura 2. Algunos de los compuestos bioactivos que se pueden encontrar en los alimentos, clasificados según su naturaleza química¹⁵

1.5 Compuestos fenólicos

Entre los ingredientes funcionales, el grupo que actualmente está generando mayor interés es el de los compuestos fenólicos, también ampliamente denominados polifenoles, debido a sus propiedades organolépticas y farmacológicas.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales tanto en su desarrollo normal como en respuesta a condiciones de estrés (polución, radiaciones UV, temperaturas extremas y parásitos, entre otras). La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una planta depende de factores como la especie o variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de maduración, así como de las condiciones de procesamiento (pelado, troceado, fritura, hervido) y almacenamiento, entre otras. Por otro lado, su distribución en los tejidos de las plantas, a nivel celular y subcelular, no es uniforme²¹:

- Las capas exteriores contienen mayores cantidades que las interiores.

²¹ Naczki, M., Shahidi, F., *Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis*, J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, 41, 1523-1542.

- Los compuestos fenólicos insolubles se encuentran en las paredes celulares (enlazados a diversos compuestos celulares contribuyen a darle resistencia mecánica), mientras que los solubles se encuentran en las vacuolas.

En las plantas desempeñan importantes funciones morfológicas y fisiológicas^{22,23}:

1. Juegan un papel muy importante en el crecimiento y reproducción (ej. las semillas acumulan importantes cantidades de fenoles en sus cubiertas que actúan como un filtro para que el oxígeno no llegue al embrión, inhibiendo su germinación),
2. Al acumularse en las capas más superficiales de los vegetales, captan las radiaciones UV, impidiendo sus efectos nocivos en los tejidos internos,
3. Pero su función más característica es establecer relaciones químicas entre la planta y su entorno: son componentes de esencias y pigmentos de las flores y frutos (confiriéndoles aromas y coloraciones atractivas para insectos y animales herbívoros, favoreciendo así la polinización y la dispersión de semillas) así como de sabores (principalmente amargos) o texturas desagradables (para que los animales se nutran de otras plantas).

Los compuestos fenólicos son, en gran parte, los responsables de las principales características organolépticas de los alimentos y bebidas procedentes de las plantas: se encuentran en frutas, verduras, plantas medicinales, especias, legumbres, cereales, frutos secos, granos, semillas, chocolate y en bebidas como el té, café, vino y cerveza^{22,24-26}. Contribuyen en su color (pigmentos amarillos, naranjas, rojos y azules), sabor (sobre todo en el amargor y astringencia), olor y estabilidad oxidativa²⁷.

En el hombre, un consumo elevado de compuestos fenólicos se ha asociado con efectos positivos para la salud, sobre todo por sus propiedades antioxidantes²⁸. Estos compuestos exhiben un rango muy amplio de propiedades fisiológicas: antialérgicos,

²² Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*, Nutrition reviews 1998, 56, 317-333.

²³ Parr, A.J., Bolwell, G.P., *Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile*, J. Sci. Food Agri. 2000, 80, 985-1012.

²⁴ Pietta, P., Minoggio, M., Bramati, L., *Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity*, Stud. Nat. Prod. Chem. 2003, 28, 257-312.

²⁵ Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*, Am. J. Clin. Nutr. 2004, 79, 727-747.

²⁶ Harnly, J.M., Bhagwat, S., Lin, L.Z., *Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements*, Anal. Bioanal. Chem. 2007, 389, 47-61.

²⁷ Cheynier, V., *Polyphenols in foods are more complex than often thought*, Am. J. Clin. Nutr. 2005, 81, 223S-229S.

²⁸ Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, J., *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*, Nutr. Hosp. 2002, 17, 271-278.

antiinflamatorios, antimicrobianos, cardioprotectores, vasodilatadores, anticancerígenos, antitrombóticos, entre otras^{22-24,29-31}. Para evaluar los efectos biológicos de estos compuestos, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es su biodisponibilidad^{24,32}, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución, metabolismo y eliminación.

El término compuesto fenólico, engloba a más de 8000 compuestos con una gran diversidad estructural, aunque todos ellos poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los criterios para clasificar estos compuestos no están claramente establecidos; una forma de hacerlo es basándose en su estructura química básica^{22,33,34}, teniendo en cuenta el número de átomos de carbono que lo constituyen y la estructura del grupo fenólico elemental. En la **figura 3** se indican las principales familias de compuestos fenólicos. Muchos de los compuestos fenólicos se encuentran en la naturaleza asociados a mono- o polisacáridos (glucósidos), o como derivados funcionales tales como ésteres o metilésteres.

²⁹ Kondratyuk, T. P., & Pezzuto, J.M., *Natural product polyphenols of relevance to human health*, Pharm. Biol. 2004, 42, 46-63.

³⁰ Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomás-Barberán, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S., *Flavonoids in food and their health benefits*, Plant Foods Hum. Nutr. 2004, 59, 113-122.

³¹ Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2005, 45, 287-306.

³² D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella R., *Bioavailability of the polyphenols: status and controversies*, Int. J. Mol. Sci. 2010, 11, 1321-1342.

³³ Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D., *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*, Analyst 2000, 125, 989-1009.

³⁴ Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., *Phenolic compounds and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses*, Food Chem. 2006, 99, 191-203.

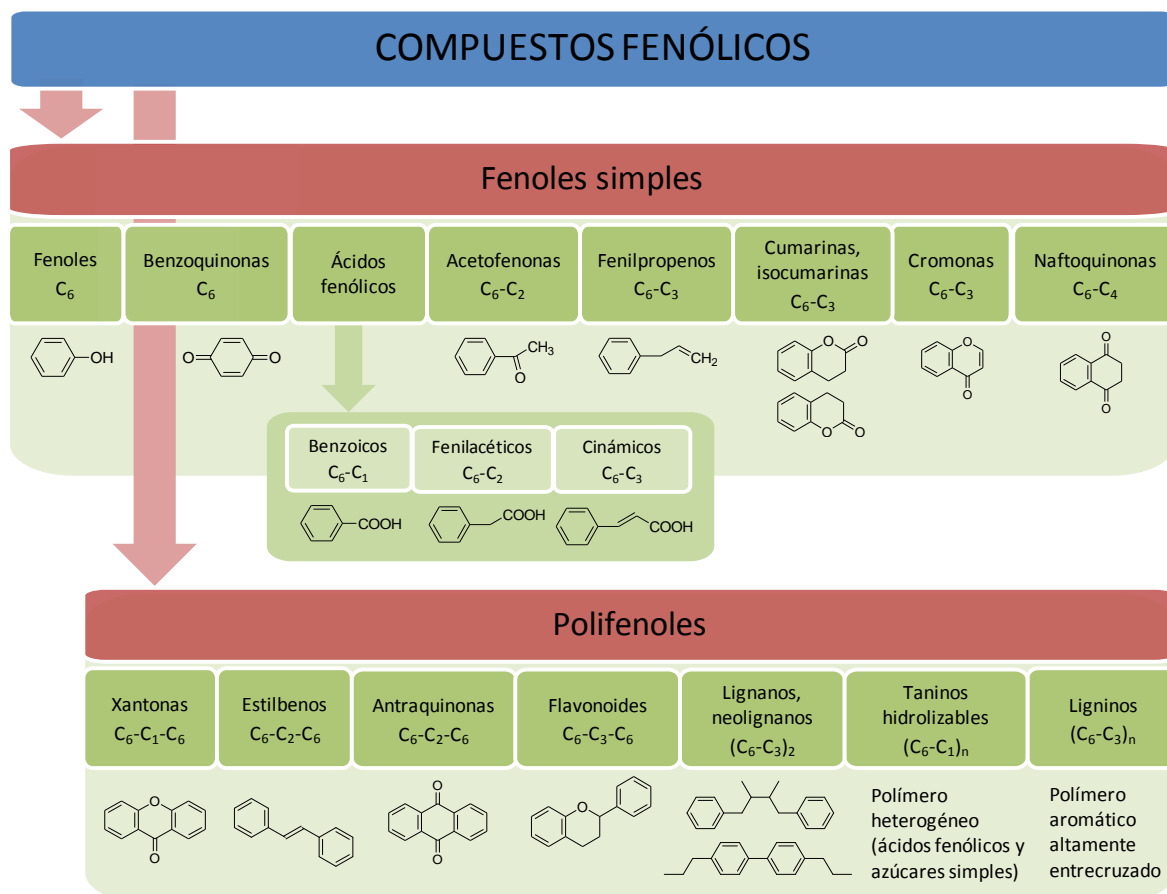


Figura 3. Clasificación de las familias de compuestos fenólicos.

Los más abundantes en la dieta son los *ácidos fenólicos*, y los *flavonoides* (30 y 60% del total, respectivamente). Los flavonoides pueden subdividirse en otras 13 clases, que se indican en la **figura 4**, con más de 5000 compuestos descritos²².

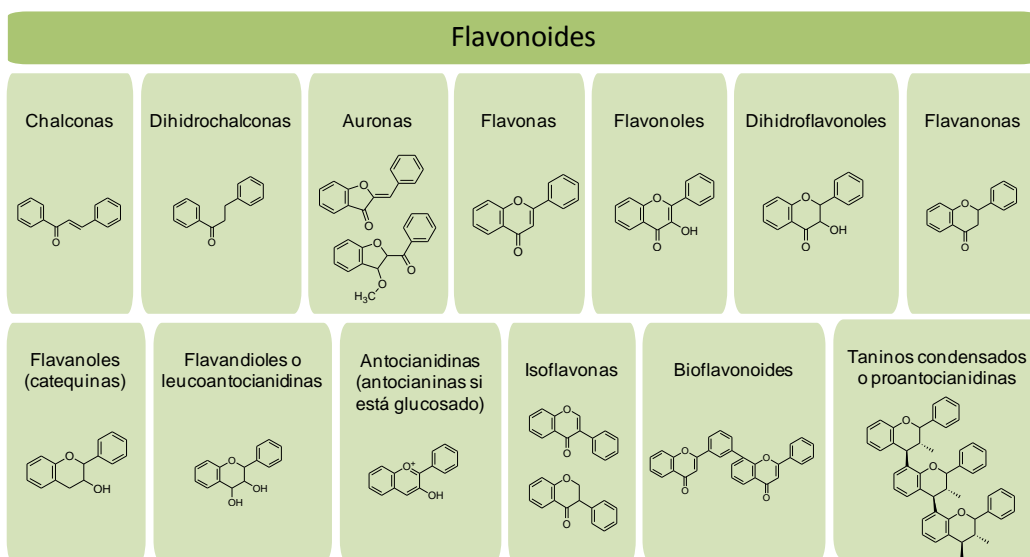


Figura 4. Clasificación de los flavonoides

La estructura común de los flavonoides consiste en dos anillos aromáticos (A y B) unidos por tres átomos de carbono que normalmente forman un heterociclo oxigenado (C). Los átomos de carbono en los dos anillos A y C se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (**figura 5**). Las distintas clases de flavonoides difieren en el nivel de oxidación y los sustituyentes de dicho heterociclo, mientras que los compuestos dentro de cada familia difieren en los sustituyentes de los dos anillos aromáticos. Los flavonoides se encuentran en las plantas en forma de aglicona o como glucósidos, siendo esta última su forma más habitual.

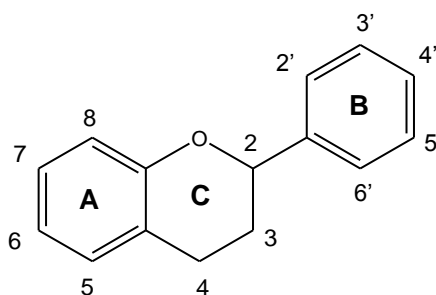


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides $C_6-C_3-C_6$ ³⁵

1.5.1 Estudios relativos a los compuestos fenólicos

Ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y por tanto muy abundantes en nuestra dieta, los compuestos fenólicos son, hoy día, uno de los compuestos fitoquímicos más estudiados. En los últimos años, las cuestiones que se están investigando en mayor profundidad son³⁶:

- Los niveles y la estructura de los compuestos fenólicos en alimentos procedentes de las plantas, plantas aromáticas y otras matrices vegetales.
- El papel de los compuestos fenólicos en la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas o el cáncer.
- La capacidad de los compuestos fenólicos para modular la actividad enzimática, una actividad que aún no ha sido entendida completamente.
- La capacidad de ciertas clases de compuestos fenólicos, como son los flavonoides, a enlazarse con las proteínas. La unión flavonol-proteína (ej. receptores y

³⁵ Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., *Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods*, J. Sep. Sci. 2005, 28, 883-897.

³⁶ Dimitrios, B., *Sources of natural phenolic antioxidants*, Trends Food Sci. Technol. 2006, 17, 505-512.

transportadores celulares) envuelve mecanismos que no están directamente relacionados con la actividad antioxidante de los polifenoles.

- La estabilización de los aceites comestibles y de su sabor, así como la protección contra la formación de malos sabores.
- La preparación de complementos alimenticios.

1.5.2 Importancia de la determinación de compuestos fenólicos

El conocimiento detallado acerca de la cantidad de compuestos fenólicos en los alimentos despierta gran interés y es de gran utilidad por distintos motivos^{37,38}:

- Ayudar a entender las propiedades saludables de la matriz analizada (actividad antioxidante, anticancerígena, etc.). La actividad de un determinado extracto se debe a todos sus componentes; no sólo los compuestos mayoritarios son los responsables de sus características, sino que también influyen los minoritarios, o las interacciones entre ellos³⁹.
- Mejora de las tablas españolas de composición de alimentos, que actualmente carecen del contenido en antioxidantes. Dichas tablas proporcionan información detallada acerca de las concentraciones de nutrientes y componentes nutricionalmente importantes en los alimentos y poseen una amplia variedad de usos, entre los que podemos mencionar⁴⁰:
 - monitorización del valor nutritivo, seguridad y autenticidad de los alimentos y del comercio de los mismos,
 - preparación de dietas institucionales y terapéuticas apropiadas,
 - educación nutricional,
 - investigaciones epidemiológicas acerca de la relación entre la dieta y las enfermedades,
 - etiquetado de alimentos,
 - desarrollo de nuevos cultivos, productos alimenticios y recetas,

³⁷ Pennington, J.A.T., *Food composition databases for bioactive food components*, J. Food. Compos. Anal. 2002, 15, 419-434.

³⁸ Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez, A., *Application and potential of capillary electrophoresis methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material*, J. Pharm. Biomed. Anal. 2010, 53, 1130-1160.

³⁹ Manach, c., Hubert, J., Llorach, R., Scalbert, A., *The complex links between dietary phytochemicals and human health deciphered by metabolomics*, Mol. Nutr. Food Res. 2009, 53, 1303-1315.

⁴⁰ The European Food Information Resource, <http://www.eurofir.net/>

- estimación de la salud e ingesta de nutrientes a nivel individual, regional, nacional...
- Uso como marcadores en estudios bio-sistemáticos de las plantas. Los compuestos fenólicos satisfacen los requisitos necesarios para poder ser usados en taxonomía (complejidad química y variación estructural, estabilidad fisiológica, amplia distribución y facilidad y rapidez de detección). Existe gran interés acerca de las funciones biológicas de los compuestos fenólicos como metabolitos secundarios de las plantas, así como sobre sus posibles efectos ecológicos (ej. comportamiento alelopático) o sobre su empleo para describir estados de maduración.
- Caracterización y control de la calidad de los alimentos:
 - el perfil polifenólico de los vegetales puede emplearse para su caracterización y como indicador químico del procesado de alimentos elaborados a partir de ellos ya que pueden producirse alteraciones de su contenido durante los procesos tecnológicos,
 - en la detección y evaluación de posibles adulteraciones o modificaciones genéticas,
 - en la autenticación de vinos, aceites de oliva, zumos de fruta y otros productos comerciales.
- Aplicaciones en la Industria Agroalimentaria como pueden ser su uso como alternativa a los antioxidantes sintéticos para preservar a los alimentos del daño oxidativo, el aprovechamiento de sub-productos o la producción de derivados menos hidrofílicos con características farmacológicas mejoradas.

2. ESTRATEGIAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN MATRICES VEGETALES

Por todo lo expuesto en la sección anterior, resulta de especial relevancia la determinación del contenido de compuestos fenólicos en los alimentos. En muchas ocasiones se trata de componentes minoritarios que se encuentran en concentraciones muy pequeñas, por lo que son necesarias técnicas analíticas sensibles, selectivas y con gran capacidad de resolución.

En general, el *proceso analítico* puede definirse como el conjunto de operaciones que separan a la muestra sin tratar y sin medir de los resultados del análisis⁴¹.



Cualquier método analítico tiene como objeto la medida de una variable que se pueda relacionar con la concentración de la especie a determinar en la muestra original. La variable medida suele estar compartida por varios compuestos o familias de compuestos, ya que existen pocas propiedades que sean específicas de una única especie, lo que hace necesario introducir una etapa de separación en el proceso analítico.

Por tanto, un método analítico para la determinación de compuestos individuales incluye fundamentalmente tres pasos: extracción de la muestra, separación analítica y detección (identificación y/o cuantificación). En la **figura 6** se representan esquemáticamente las distintas estrategias usadas en la caracterización de los compuestos fenólicos en los alimentos y bebidas de origen vegetal.

⁴¹ Valcárcel Cases, M., Gómez Hens, A., *Técnicas analíticas de separación*, Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1990.

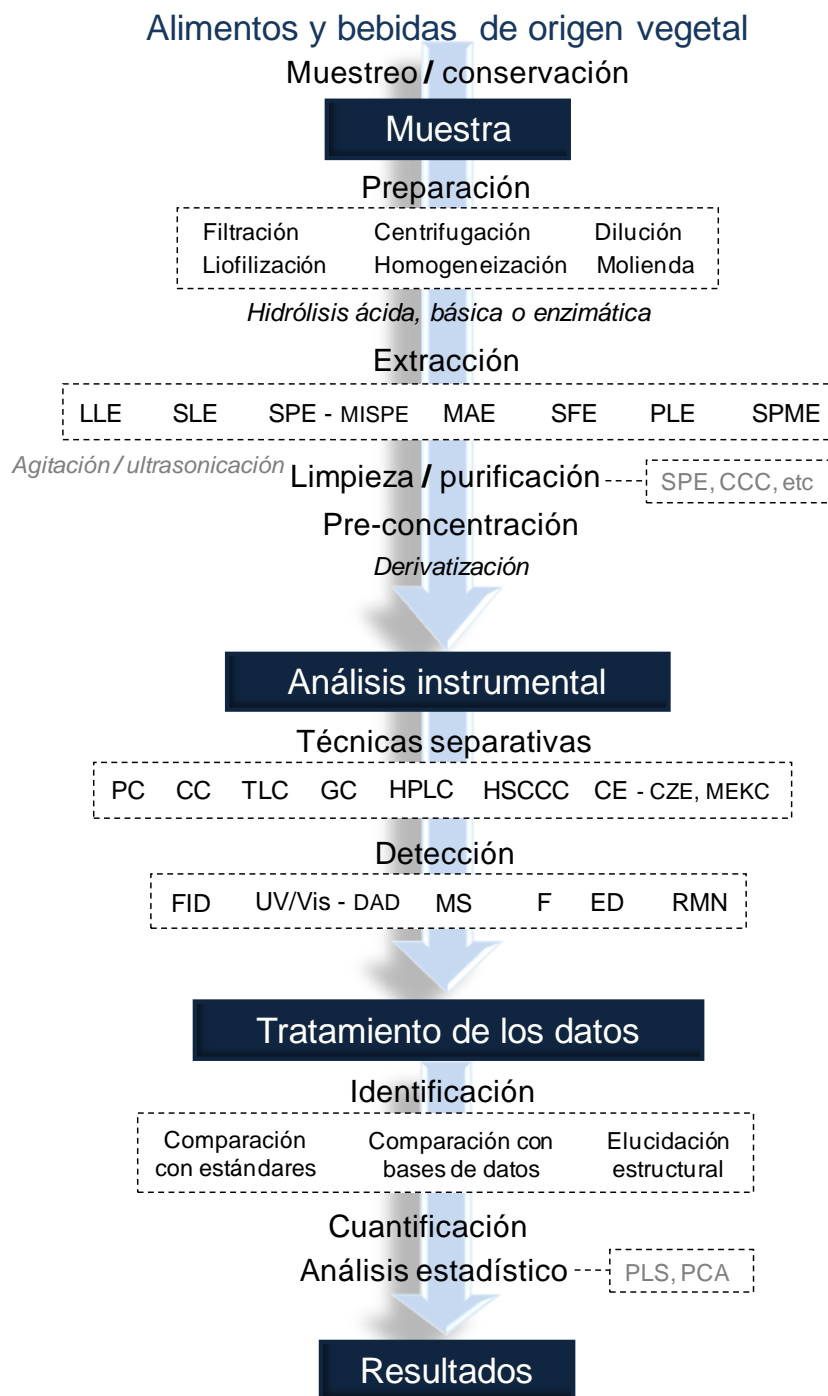


Figura 6. Proceso analítico completo para la determinación de compuestos fenólicos en muestras alimenticias de origen vegetal, incluyendo el tratamiento de muestra, análisis instrumental y tratamiento de los datos³⁸

Abreviaturas: **CC**, cromatografía en columna; **CCC**, cromatografía en contracorriente; **CE**, electroforesis capilar; **CZE**, electroforesis capilar en zona; **ED**, detección electroquímica; **F**, fluorescencia; **FID**, detector de ionización de llama; **GC**, cromatografía de gases; **HPLC**, cromatografía líquida de alta resolución; **HSCCC**, cromatografía en contracorriente de alta velocidad; **LLE**, extracción líquido-líquido; **MAE**, extracción asistida por microondas; **MECK**, cromatografía capilar electrocinética micelar; **MISPE**, extracción en fase sólida mediante polímeros de impronta molecular; **MS**, espectrometría de masas; **PC**, cromatografía plana; **PCA**, componentes principales; **PLE**, extracción con líquidos presurizados; **PLS**, mínimos cuadrados parciales; **RMN**, resonancia magnética nuclear; **SFE**, extracción con fluidos supercríticos; **SLE**, extracción sólido-líquido; **SPE**, extracción en fase sólida; **SPME**, micro-extracción en fase sólida; **TLC**, cromatografía en capa fina.

Dado que el objeto de la presente memoria es el desarrollo y la evaluación de estrategias analíticas de utilidad en las distintas etapas del proceso analítico para la extracción, separación e identificación de compuestos fenólicos, a lo largo de esta sección, además de describir la metodología general empleada para alcanzar tal fin, se detallarán las características de las técnicas utilizadas en esta tesis: síntesis de polímeros de impronta molecular y desarrollo de métodos en electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta resolución utilizando detección UV-Vis y espectrometría de masas como sistemas de detección.

2.1 Tratamiento de muestra

El tratamiento de muestra es una etapa decisiva del proceso analítico, ya que condiciona notablemente los resultados que se obtengan. El objetivo de esta etapa es aislar los compuestos fenólicos del resto de la matriz para conseguir un extracto uniformemente enriquecido en todos los compuestos de interés y libre de interferentes procedentes de la matriz³³.

Tanto la naturaleza de la matriz como la de los analitos bajo estudio van a influir en el tratamiento de la muestra:

- Según el tipo de alimento o matriz vegetal a analizar, variará la complejidad del protocolo de extracción a seguir.
- Entre los compuestos fenólicos existe gran variedad de estructuras y propiedades químicas. Pueden presentarse libres o conjugados con azúcares, en forma de ésteres o formando polímeros; no se encuentran uniformemente distribuidos en la planta y pueden estar unidos a paredes celulares, carbohidratos o proteínas; su estabilidad, acidez, polaridad y solubilidad, entre otras propiedades, varían enormemente^{42,43}.

Por todo ello, es prácticamente imposible desarrollar un protocolo de extracción único y eficaz para todos los compuestos fenólicos contenidos en matrices alimenticias. A continuación, se van a recoger los métodos y condiciones usados más frecuentemente en bibliografía.

⁴² Escarpa, A., González, M.C., *An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods*, Crit. Rev. Anal. Chem. 2001, 31, 57-139.

⁴³ Nazck, M., Shahidi, F., *Extraction and analysis of phenolics in foods*, J. Chromatogr. A 2004, 1054, 95-111.

❖ **Muestreo y conservación.** La muestra a analizar debe ser obtenida de manera que represente a la totalidad de la muestra original, y debe tenerse en cuenta qué partes del vegetal han sido seleccionadas (ej. el contenido en compuestos fenólicos varía considerablemente según seleccionemos la parte comestible, piel o semillas de una fruta). Por otro lado, la conservación adecuada de la muestra asegura que ésta mantenga sus características físico-químicas desde el momento en que se recolecta hasta que es analizada. En general, ambas etapas se infravaloran y no son documentadas debidamente⁴⁴.

❖ **Preparación de la muestra.** El pretratamiento de la muestra se realiza por distintos motivos: aumentar la eficacia del procedimiento de extracción, eliminar o reducir interferentes, mejorar la sensibilidad del método analítico aumentando la concentración del analito de interés, o bien para convertir al analito en un derivado que pueda ser más fácilmente separado, detectado y/o cuantificado⁴⁴.

Los procedimientos para preparar la muestra varían notablemente, dependiendo, como ya se ha comentado, de la gran variedad de compuestos fenólicos y sobre todo de la complejidad de la muestra (en especial de su estado físico). En general, las muestras sólidas, como la manzana o el tomate, son liofilizadas o secadas con aire (el secado en horno no es recomendable ya que puede producir degradación térmica) y, posteriormente, son sometidas a molienda y homogeneización. Sin embargo, las muestras líquidas como el vino, té o zumos, requieren una manipulación previa mínima: se filtran, centrifugan y/o diluyen para luego ser sometidas, bien al proceso de extracción, o bien analizadas directamente^{45,46}. Es recomendable congelar la muestra antes de su extracción ya que los cristales de hielo producen lesiones en la estructura celular facilitando la salida de sus componentes y, por tanto, el proceso de extracción⁴⁷.

Hidrólisis. Realizar la hidrólisis de los compuestos fenólicos conjugados puede tener distintos propósitos: como herramienta para la elucidación estructural y caracterización de glucósidos, para eliminar interferencias en los análisis subsiguientes o para simplificar los análisis y el tratamiento de datos (sobre todo si no existen patrones comerciales). No obstante, hay que tener en cuenta la inestabilidad del enlace glicosídico

⁴⁴ Luthria, D., *Significance of sample preparation in developing analytical methodologies for accurate estimation of bioactive compounds in functional foods*, J. Sci. Food Agric. 2006, 86, 2266-2272, y sus referencias.

⁴⁵ Robbins, R.J., *Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology*, J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 2866-2887, y sus referencias.

⁴⁶ Stalikas, D.C., *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids*, J. Sep. Sci. 2007, 30, 3268-3295, y sus referencias.

⁴⁷ Santos-Buelga, C., Williamson, G. *Methods in polyphenol analysis*, RSC, Cambridge, 2003.

bajo las condiciones de hidrólisis y las posibles reorganizaciones que puedan ocurrir, así como la pérdida de información acerca del contenido de los compuestos conjugados originales. Se pueden llevar a cabo tres tipos de reacciones de hidrólisis: ácida, básica (saponificación) y enzimática. La hidrólisis ácida y básica son las más empleadas aunque existe poco consenso en las condiciones de reacción (tiempo, temperatura e incluso concentración de reactivos varían de unos autores a otros)^{45,48}.

❖ **Extracción.** Es la etapa crucial para la recuperación y aislamiento de los compuestos fenólicos antes de su análisis. La selección de la técnica a utilizar va a depender, una vez más, de la naturaleza y concentración de los analitos y de la muestra (estado físico, tamaño de partícula, presencia de interferentes) y de si el objetivo del análisis es cuali- o cuantitativo.

Extracción líquido-líquido (LLE) y sólido-líquido (SLE). Son las técnicas más empleadas en la extracción de compuestos fenólicos de matrices líquidas y sólidas, respectivamente, sobre todo por su facilidad de uso, eficacia y gran aplicabilidad. Los factores que influyen en la eficacia de la extracción son⁴⁷:

✓ *Naturaleza del disolvente.* El disolvente más usado es metanol y las mezclas metanol/agua. También se utilizan otros disolventes como etanol, acetona, dietiléter, acetato de etilo o mezclas de ellos, pero suelen tener menores rendimientos. Las mezclas con agua son recomendables en la extracción de los compuestos más polares (ácidos fenólicos o compuestos glucosilados). Se utilizan disolventes menos polares como hexano o benceno para extraer compuestos apolares que puedan interferir (cera, grasas, esteroides pigmentos)⁴⁶.

✓ *pH del medio de extracción.* Determina el grado de solubilidad de los compuestos y puede influir en la posible solubilización de la fracción hidrolizable.

✓ *Temperatura.* Temperaturas altas mejoran la eficacia de extracción, ya que el calor hace más permeables las paredes celulares, aumenta la solubilidad y los coeficientes de difusión de los compuestos fenólicos y disminuye la viscosidad del disolvente, facilitando su acceso al sustrato sólido y el proceso posterior de separación. Sin embargo, temperaturas excesivas pueden producir la degradación de los compuestos fenólicos por lo que no se suelen emplear temperaturas demasiado elevadas.

✓ *Número de repeticiones y relación volumen de disolvente/tamaño de muestra.* La eficacia de la extracción aumenta junto con el número de repeticiones, siendo más eficaz,

⁴⁸ Robards, K., *Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables*, J. Chromatogr. A 2003, 657-691, y sus referencias.

por ejemplo, llevar a cabo 4 extracciones con 50 ml que una con 200 ml. En general, se obtienen rendimientos cuantitativos sólo cuando extraemos la matriz vegetal de 3 a 5 veces.

✓ *Tamaño y forma de partícula.* En el caso de muestras sólidas, un pretratamiento eficaz de homogeneización aumenta la superficie de contacto entre la muestra y el disolvente.

✓ *Tiempo de extracción.* Los periodos de extracción varían desde 1 min hasta 24 h. Tiempos de extracción superiores incrementan la posibilidad de oxidación de los compuestos fenólicos, a menos que se añadan agentes reductores externos⁴³.

Numerosos autores utilizan medios mecánicos (vórtex, ultrasonidos o rotor giratorio) para incrementar las interacciones moleculares⁴⁵.

Extracción en fase sólida (SPE). Es una alternativa rápida, fácil y económica a la extracción con disolventes, ya que con ella se reduce el uso de disolventes orgánicos y la utilización de material frágil. Consiste en hacer pasar la disolución que contiene los analitos de interés sobre una fase sólida desechable que los adsorbe de manera específica. De este modo, se eliminan los interferentes, reteniendo los compuestos bajo estudio. Tras la adsorción, los analitos son extraídos con una pequeña cantidad de disolvente que tiene más afinidad por ellos que la fase sólida. Se utiliza tanto para extraer directamente los compuestos fenólicos de muestras líquidas, como complemento a las técnicas de extracción con disolventes o como método de fraccionamiento, limpieza/purificación y/o pre-concentración de extractos⁴⁷.

Las fases sólidas adsorbentes que existen en el mercado son muy numerosas y poseen distintos formatos (ej. disco de pocos centímetros de diámetro, pequeña columna empaquetada, embudo empacado parcialmente). Los cartuchos de C₁₈ son la fase sólida más utilizada para la extracción de ácidos fenólicos y flavonoides.

Hoy día, uno de los campos de investigación que está suscitando mayor interés es la búsqueda de nuevos materiales adsorbentes que permitan la extracción selectiva de los analitos de interés; entre las nuevas fases adsorbentes desarrolladas destacan los **polímeros de impronta molecular** (MIPs)⁴⁹⁻⁵³. En el siguiente apartado se comentará con

⁴⁹ Haupt, K., *Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry*, Analyst 2001, 126, 747-756, y sus referencias.

⁵⁰ Masqué, N., Marcé, R.M., Borrull, F., *Molecularly imprinted polymers: new tailor-made materials for selective solid-phase extraction*, TrAC 2001, 20, 477-486, y sus referencias.

⁵¹ Lanza, F., Sellergen, B., *The application of molecular imprinting technology to solid phase extraction*, Chromatographia, 2001, 53, 599-611, y sus referencias.

más detalle esta tecnología emergente que se ha desarrollado en el trabajo experimental de esta tesis.

La creciente demanda de nuevas técnicas de extracción que se puedan automatizar, más eficientes y que permitan reducir los volúmenes de disolvente y el tiempo de extracción, ha propiciado el desarrollo de metodologías más sofisticadas^{54,55}:

- **Extracción asistida por microondas (MAE).** Combina la extracción tradicional con disolvente con el uso de un microondas. Debido a que los disolventes con una constante dieléctrica alta absorben más la energía de las microondas, la polaridad del disolvente es un parámetro importante.
- **Extracción con fluidos supercríticos (SFE).** Los fluidos supercríticos poseen las características tanto de un gas como de un líquido, lo que hace ventajoso su uso en un proceso de extracción: su baja viscosidad le da gran capacidad de difusión (acceso a los compuestos a través de las paredes celulares), mientras que su relativamente alta densidad le proporciona gran capacidad de solvatación. El fluido supercrítico más usado es el CO₂ aunque al ser apolar, para poder extraer compuestos polares como los polifenoles es necesario o bien añadirle modificadores o bien derivatizar los compuestos para disminuir su polaridad.
- **Extracción con líquidos presurizados (PLE).** Utiliza disolventes convencionales pero a elevadas presiones y temperaturas para acelerar la extracción de los compuestos: la presión aumenta el contacto entre el disolvente y la muestra, mientras que las altas temperaturas rompen las uniones compuesto fenólico-matriz. También se le llama extracción acelerada con disolventes y extracción con agua subcrítica, si es agua lo que se usa como disolvente.
- **Micro-extracción en fase sólida (SPME).** Se basa en la adsorción de los analitos por una fase sólida inmovilizada sobre una fibra de sílice fundida. Una vez alcanzado el equilibrio, los compuestos adsorbidos se desorben térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases o se redisuelven para analizarlos por cromatografía líquida.

⁵² Ensing, K., Berggren, C., Majors, R.E., *Selective sorbents for solid-phase extraction based on molecularly imprinted polymers*, LC-GC Europe 2002, 15, 2-8, y sus referencias.

⁵³ Tamayo, F.G., Turiel, E., Martín-Esteban, A., *Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends*, J. Chromatogr. A 2007, 1152, 32-40, y sus referencias.

⁵⁴ Tura, D., Robards, K., *Sample handling strategies for the determination of biophenols in foods and plants*, J. Chromatogr. A 2002, 975, 71-93, y sus referencias.

⁵⁵ Tsao, R., Deng, Z., *Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals*, J. Chromatogr. B 2004, 812, 85-99, y sus referencias.

❖ **Limpieza / purificación y pre-concentración.** En el caso de muestras sólidas, una vez acabada la etapa de extracción es necesario separar el extracto obtenido de la matriz mediante centrifugación o filtración (aunque ésta última es menos recomendable por la posible retención de algunos compuestos)⁴⁷.

Por otro lado, como los extractos obtenidos pueden contener un gran número de compuestos no-fenólicos como azúcares, terpenos y pigmentos que pueden interferir en el análisis posterior, es recomendable una etapa de purificación o limpieza. Hay varias estrategias posibles, como extracciones secuenciales, partición líquido-líquido o SPE.

La técnica más descrita en bibliografía para el fraccionamiento de una mezcla de ácidos fenólicos y polifenoles, aunque también la menos eficiente, es la basada en la distinta acidez de ambos tipos de compuestos: el pK_a de los hidrógenos fenólicos está en torno a 10 mientras que el del protón carboxílico del ácido fenólico oscila entre 4-5⁴⁶. La *cromatografía en contracorriente* (CCC), por otro lado, está ganando popularidad. En esta técnica, la separación de los compuestos está basada en su reparto entre dos líquidos inmiscibles.

Habitualmente los extractos se concentran evaporando a vacío hasta sequedad a baja temperatura. El extracto seco se reconstituye en el disolvente más adecuado para su posterior análisis.

❖ **Derivatización.** Una característica química del grupo OH es su capacidad de formar puentes de hidrógeno, aumentando el punto de fusión del compuesto y originando que los compuestos fenólicos sean en general poco volátiles. Por tanto, para su análisis en fase gaseosa la mayoría de los compuestos fenólicos debe sufrir una modificación química (derivatización), que aumente su volatilidad y estabilidad térmica. Se consiguen derivados más volátiles convirtiendo los grupos hidroxilo en éteres o ésteres mediante alquilación, acilación o sililación⁴⁶.

2.2 Polímeros de impronta molecular (MIPs)

En los últimos años, se ha producido un crecimiento exponencial del número de publicaciones dedicadas a la técnica de impronta molecular y, por tanto, del volumen de aplicaciones desarrolladas^{56,57}. Desde su primera aplicación en 1972, dentro del campo de los polímeros orgánicos, los MIPs se han empleado con éxito en el análisis químico, medioambiental, clínico, en ciencia de los materiales y de los alimentos o en biotecnología, en áreas tan variadas como separaciones^{53,58,59}, sensores⁶⁰, síntesis y catálisis⁶¹. La necesidad de extraer selectivamente compuestos de interés de mezclas complejas es lo que ha conducido al gran aumento en el uso de estas nuevas fases adsorbentes basadas en MIPs.

Un MIP es un tipo de elemento de reconocimiento molecular con base de polímero fuertemente entrecruzado, diseñado para unirse de forma selectiva a un compuesto o familia de compuestos que estén estrechamente relacionados estructuralmente.

El término polímeros de impronta molecular se traduce literalmente del inglés *molecularly imprinted polymers* (imprint = huella, impronta), pero se mantiene el acrónimo original MIPs. El término impronta se utiliza en Paleontología de forma habitual para referirse a la huella que deja un organismo sobre el material que lo rodea antes de descomponerse, dando lugar a un fósil (no se observa por tanto la estructura original del organismo, sino el espacio que deja). Podríamos considerar que este proceso natural presenta cierta analogía a la técnica que aquí se presenta.

⁵⁶ Piletsky, S.A., Alcock, S., Turner, A.P.F., *Molecular imprinting: at the edge of the third millennium*, *Trends Biotechnol.* 2001, 19, 9-12, y sus referencias.

⁵⁷ Alexander, C., Andersson, H.S., Andersson, L.I., Ansell, R.J., Kirsch, N., Nicholls, I.A., O'Mahony, J., Whitcombe, M.J., *Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003*, *J. Mol. Recogn.* 2006, 19, 106-180, y sus referencias.

⁵⁸ Lasáková, M., Jandera, P., *Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction*, *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 799-812, y sus referencias.

⁵⁹ Turiel, E., Martín-Esteban, A., *Molecularly imprinted polymers: towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis*, *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 1876-1886, y sus referencias.

⁶⁰ Holthoff, E.L., Bright, F.V., *Molecularly templated materials in chemical sensing*, *Anal. Chim. Acta* 2007, 594, 147-161, y sus referencias.

⁶¹ Alexander, C., Davidson, L., Hayes, W., *Imprinted polymers: artificial molecular recognition materials with applications in synthesis and catalysis*, *Tetrahedron* 2003, 59, 2025-2057, y sus referencias.

2.2.1 Conceptos básicos sobre polímeros. Reacciones de polimerización

Un polímero es una gran molécula construida por la repetición de pequeñas unidades químicas simples denominadas monómeros⁶². En algunos casos, la repetición es lineal, de forma semejante a como una cadena la forman sus eslabones. Cuando los monómeros son multifuncionales, las cadenas pueden presentar una estructura ramificada e incluso pueden acabar entrecruzándose (crosslinking) con otras ramificaciones o cadenas existentes en el medio, originando una estructura de red o reticulada (*fig. 7*).

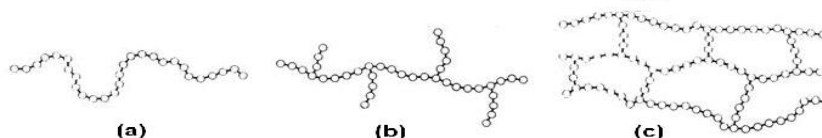


Figura 7. Tipos de polímero: (a) lineal, (b) ramificado, (c) reticulado

La longitud de la cadena del polímero viene especificada por el número de unidades que se repiten en la cadena (grado de polimerización). El peso molecular del polímero es el producto del peso molecular de la unidad de repetición por el grado de polimerización.

La unidad de repetición del polímero es usualmente equivalente o casi equivalente al monómero o material de partida del que se forma el polímero; la transformación monómero/polímero se lleva a cabo mediante las reacciones de polimerización⁶³. Aunque existe una gran variedad de ellas, es posible clasificarlas en dos grandes grupos atendiendo al mecanismo que da lugar a la formación del polímero:

- 1. Polimerización de condensación o de reacción por etapas.** En la formación del polímero la condensación tiene lugar entre dos moléculas multifuncionales para producir una molécula multifuncional mayor, con la posible eliminación de una molécula pequeña como el agua. La reacción continúa hasta que se ha utilizado casi la totalidad de uno de los reactivos; se establece un equilibrio que puede desplazarse a voluntad a altas temperaturas controlando las cantidades de los reactivos y productos.
- 2. Polimerización de adición o de reacción en cadena.** Implica reacciones en cadena en las que el portador de la cadena es un radical libre que normalmente se forma por la descomposición de un material relativamente inestable llamado iniciador. El mecanismo de reacción se caracteriza por tres etapas: iniciación,

⁶² Billmeyer, W., *Ciencia de los polímeros*, Editorial Reverté S.A., Barcelona, 2004.

⁶³ Areizaga, J., Cortázar, M.M., Elorza, J.M., Iruin, J.J., *Polímeros*, Editorial Síntesis S.A., Madrid, 2002.

propagación y terminación. El radical libre es capaz de reaccionar para abrir el doble enlace de un monómero de vinilo y adicionarse a él, quedando un electrón desapareado. En un tiempo muy breve muchos más monómeros se suman sucesivamente a la cadena que crece. Finalmente, dos radicales libres reaccionan aniquilando recíprocamente su actividad de crecimiento, formando una o más moléculas de polímero.

Desde el punto de vista práctico, resultan muy interesantes las polimerizaciones de adición que se llevan a cabo en presencia de monómeros multifuncionales ya que, como ya se ha mencionado previamente, no sólo conducen a polímeros ramificados sino que pueden generar entrecruzamiento entre cadenas. Existen varias metodologías para sintetizar polímeros entrecruzados: polimerización en disolución, por precipitación, en suspensión, en emulsión, etc., que se comentarán más adelante.

2.2.2 Síntesis de MIPs

Los MIPs son matrices porosas sintetizadas artificialmente que presentan propiedades de reconocimiento molecular específico hacia determinados compuestos. Esta selectividad se introduce durante la síntesis del polímero, en la que una plantilla molecular o molécula molde (el analito de interés o un derivado de éste) sirve de modelo para la formación de las cavidades específicas. Para ello, se pone inicialmente en contacto la molécula molde con uno o varios monómeros adecuados con el fin de formar un complejo de prepolimerización, al que se le añade el entrecruzador, iniciador y disolvente (porógeno) en el que se lleva a cabo la polimerización. Una vez obtenido el polímero, se extrae la molécula molde, liberando los sitios de reconocimiento específico.

Por tanto, la síntesis de un MIP consta de tres etapas básicas⁶⁴, que aparecen esquematizadas en la **figura 8**. Durante la primera etapa, se ponen en contacto la molécula molde y el monómero, dando lugar a la formación del complejo de prepolimerización. En la segunda etapa se lleva a cabo la polimerización propiamente dicha, que generalmente sigue un mecanismo de propagación radicalaria y puede estar inducida tanto térmica como fotoquímicamente. Por último, en la tercera etapa, se elimina la molécula molde de la matriz polimérica, liberando así las cavidades creadas que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química a la molécula molde. La molécula molde se extrae del material

⁶⁴ Komiyama, M., Takeuchi, T., Makuwa, T., Asanuma, H., *Molecular imprinting: from fundamentals to applications*, Wiley-VCH, Alemania, 2003.

utilizando un disolvente capaz de anular las interacciones específicas o con tratamientos químicos más agresivos, según sea el tipo de interacción molécula molde/monómero funcional, como se verá a continuación. La presencia de estas cavidades hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer de forma selectiva tanto al analito de interés como a otros compuestos estructuralmente análogos.

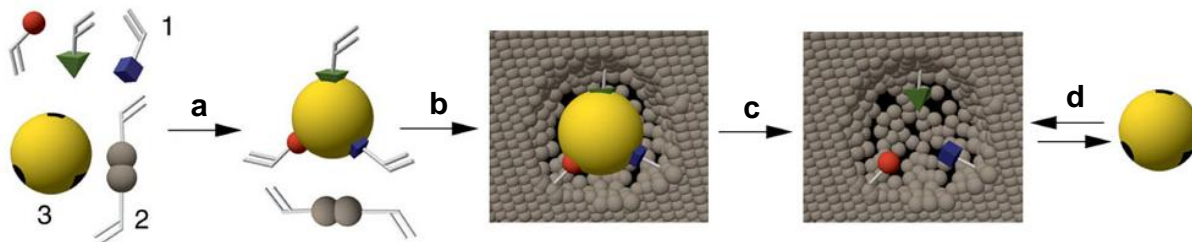


Figura 8. Representación esquemática de las etapas implicadas en la síntesis de MIPs. 1: monómeros funcionales, 2: entrecruzador, 3: molécula molde; **a)** formación del complejo de pre-polimerización, **b)** polimerización, **c)** extracción del molde liberando los sitios de unión, **d)** unión selectiva con el analito de interés⁶⁵.

La naturaleza de la interacción entre el monómero y molécula molde es actualmente uno de los criterios más empleados para la clasificación de los MIPs, ya que afecta considerablemente a las propiedades del polímero final obtenido. Así, es posible distinguir entre polímeros covalentes, semi-covalentes y no covalentes⁶⁴⁻⁶⁷, cuyas principales características se describen a continuación.

Es importante destacar que, cualquiera que sea el método empleado, para poder evaluar la capacidad de reconocimiento molecular selectivo de un MIP, debe sintetizarse un polímero de control (*non-imprinted polymer* o NIP) en las mismas condiciones que el MIP pero en ausencia de molécula molde.

Impronta covalente. Los polímeros covalentes se caracterizan porque la unión se realiza a través de un enlace covalente “reversible” entre la molécula molde y el monómero, tanto durante la polimerización, como en el reconocimiento posterior de los analitos. Los MIPs obtenidos de este modo se caracterizan por poseer unos centros activos muy homogéneos y una extraordinaria selectividad ya que, gracias a la síntesis en condiciones

⁶⁵ Haupt, K., *Imprinted polymers – Tailor-made mimics of antibodies and receptors*, Chem. Commun. 2003, 2, 171-178, y sus referencias.

⁶⁶ Mayes, A.G., Whitcombe, M.J., *Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers*, Adv. Drug Deliv. Rev. 2005, 57, 1742-1778, y sus referencias.

⁶⁷ Cormack, P.A.G., *Imprinted polymers* in Atwood, J.L., Steed, J.W, Encyclopedia of supramolecular chemistry, Marcel Dekker, Inc. New York, 2006.

estequiométricas, no hay monómeros fuera de las cavidades, lo que minimiza considerablemente la presencia de interacciones inespecíficas.

Entre los principales inconvenientes de este método de síntesis se encuentran el limitado número de monómeros existentes capaces de formar un enlace covalente reversible con la molécula molde, la necesidad de sintetizar previamente el compuesto “molécula molde-monómero”, la ruptura química del enlace covalente formado para eliminar el molde del polímero y la lenta cinética de unión. Debido a estas limitaciones, y a pesar de haber sido los primeros MIPs en desarrollarse en 1972 por Wulff y Sarha⁶⁸, su aplicación analítica ha sido considerablemente escasa.

Impronta semi-covalente. Los polímeros semi-covalentes fueron descritos en 1990 por Sellergren y Anderson⁶⁹. En estos polímeros, aunque la interacción inicial formada entre la molécula molde y los monómeros funcionales es a través de un enlace covalente, aquella implicada en el reconocimiento selectivo posterior es de naturaleza no covalente. Los polímeros semi-covalentes presentan varias ventajas análogas a las descritas para el caso de los polímeros covalentes, es decir, su gran selectividad y una mayor homogeneidad en la distribución de puntos de unión en la matriz polimérica. Destaca también su gran versatilidad a la hora de utilizarse en diferentes condiciones de polimerización.

El principal inconveniente de este tipo de polímeros deriva de las diferencias estéricas entre los enlaces covalente y no covalente, ya que se necesita una mayor distancia para formar el enlace no covalente que uno covalente. Esta limitación fue resuelta por Whitcombe y col.⁷⁰, que en 1995 sintetizaron un MIP utilizando el grupo carbonilo como “espaciador sacrificable” (se elimina junto con la molécula molde) entre el monómero funcional y la plantilla molecular.

Impronta no covalente. Los polímeros no covalentes son aquellos en los que la interacción entre la molécula molde y el monómero tiene lugar a través de la formación de enlaces intermoleculares débiles (tipo puentes de hidrógeno, interacciones π - π , dipolo-dipolo, electrostáticas, hidrofóbicas y/o fuerzas de Van der Waals), tanto durante la síntesis del polímero, como durante el reconocimiento posterior de los analitos.

⁶⁸ Wulff, G., Sarhan, A., *Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung*, *Angew. Chemie* 1972, 84, 364.

⁶⁹ Sellergren, B., Andersson, L.I., *Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate analogue imprinting strategy*, *J. Org. Chem.* 1990, 55, 3381-3383.

⁷⁰ Whitcombe, M.J., Rodríguez, M.E., Villar, P., Vulfsson, E.N., *A new method for the introduction of recognition site functionality into polymers prepared by molecular imprinting: synthesis and characterization of polymeric receptors for cholesterol*, *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 7105-7111.

Debido a la amplia disponibilidad comercial de monómeros y analitos capaces de dar lugar a interacciones estables de este tipo y a la facilidad de la síntesis de estos materiales, los polímeros no covalentes son, sin lugar a dudas, los más empleados en la actualidad^{57,71} desde su desarrollo por Arshady y Mosbach en 1981⁷².

Entre los principales inconvenientes de este tipo de materiales se encuentran su menor selectividad, que conduce a la coelución de especies interferentes en muestras complejas cuando se emplean como fases estacionarias, y su distribución no uniforme (heterogeneidad) de los sitios de unión presentes en la matriz polimérica, lo que da lugar a un ensanchamiento de los picos cromatográficos o un empeoramiento de la linealidad de los sensores.

2.2.2.1 Variables experimentales en la síntesis de MIPs^{73,74}

- **Molécula molde.** Dirige la organización de los grupos funcionales de los monómeros durante el proceso de impronta molecular y debe ser químicamente inerte bajo las condiciones de polimerización con radicales. A la hora de seleccionar un analito como molécula molde deben plantearse las siguientes preguntas: **i)** ¿contiene grupos polimerizables?, **ii)** ¿contiene alguna función que pueda inhibir o retardar la polimerización de reacción en cadena?, **iii)** ¿es estable a temperaturas elevadas o a la exposición de radiación UV?
- **Monómero funcional.** Es el responsable de las interacciones en los sitios de unión del MIP y por tanto, debe elegirse de modo que su funcionalidad sea complementaria con la del analito (ej. dador/aceptor de H). En la impronta no covalente suele usarse en exceso con respecto a la molécula molde para favorecer la formación del complejo de prepolimerización (la relación molar típica molécula molde/monómero funcional es 1:4). En algunos casos pueden combinarse distintos monómeros para incrementar las interacciones y mejorar la complementariedad de la molécula molde proporcionando una mejor selectividad.

⁷¹ Wei, S., Mizaiakoff, B., *Recent advances on noncovalent molecular imprints for affinity separations*, J.Sep. Sci. 2007, 30, 1794-1805, y sus referencias.

⁷² Arshady, R., Mosbach, K., *Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization*, Makromol. Chem. 1981, 182, 687-692.

⁷³ Cormack, P.A.G., Zurutuza Elorza, A., *Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation*, J. Chromatogr. B 2004, 804, 173-182.

⁷⁴ Yan, H., Row, K.H., *Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer*, Int. J. Mol. Sci. 2006, 7, 155-178.

- **Entrecruzador.** Cumple tres funciones fundamentales en el proceso de impronta: es el principal responsable de la morfología de la matriz polimérica, estabiliza los sitios de unión selectivos formados en la impronta y confiere estabilidad mecánica a la matriz polimérica. En general, se prefieren elevados grados de entrecruzamiento (>80%) para asegurar la obtención de materiales macroporosos con una estabilidad mecánica adecuada.
- **Disolvente (porógeno).** Tiene un papel doble, como disolvente clásico y como agente porogénico, de manera que la naturaleza y la cantidad de disolvente usado sirve para controlar la morfología y el volumen total de poros que se crean en el polímero. Además, el disolvente en la impronta no covalente influye drásticamente en la interacción monómero-molécula molde; en general, disolventes apróticos, como tolueno o acetonitrilo, estabilizan la unión por puentes de hidrógeno, mientras que los disolventes próticos (agua) son los adecuados para las interacciones de carácter hidrofóbico.
- **Iniciador.** El iniciador es el responsable del comienzo de la polimerización al introducir radicales en el sistema. Dependiendo de su estructura, la polimerización puede comenzar empleando radiación UV o por inducción térmica. La elección del iniciador se realiza en función de las características del resto de componentes del sistema, como por ejemplo la estabilidad de los reactivos empleados. El azo-derivado 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) es el compuesto más utilizado, en cantidades del 1% en peso o en moles respecto al número total de dobles enlaces polimerizables.
 - **Condiciones de polimerización.** Antes de llevar a cabo la polimerización, es recomendable eliminar tanto los inhibidores que acompañan a la gran mayoría de monómeros (que se añaden para evitar su auto-polimerización) como el oxígeno disuelto en la disolución (ya que retarda las polimerizaciones con radicales libres). Otra variable a tener en cuenta es la temperatura en la que se lleva a cabo la polimerización, ya que afecta al equilibrio entre la molécula molde y los monómeros funcionales. En general, se prefieren temperaturas en torno a 60 °C, pues proporcionan una mayor selectividad al polímero.

2.2.2.2 Metodología de polimerización

La metodología de polimerización (en disolución, por precipitación, en suspensión, etc.) influye sobre la morfología del polímero obtenido. A continuación, se describen únicamente aquellas que se han empleado en la parte experimental de esta memoria.

Polimerización en disolución o en monolito (del inglés “*monolith polymerisation*”).

Es el procedimiento más usado para la síntesis de MIPs y consiste en la polimerización radicalaria de una solución concentrada de monómeros. Los monómeros se disuelven en el porógeno, se añade el iniciador y, una vez que el oxígeno se ha eliminado del sistema, comienza la reacción en cadena empleando radiación UV o por acción del calor. El polímero que se va formando, llena el matraz de reacción, y una vez termina la reacción de polimerización, el matraz debe romperse para poder recuperar el polímero obtenido, el cual se molutra hasta el tamaño de partícula deseado (**fig. 9**).

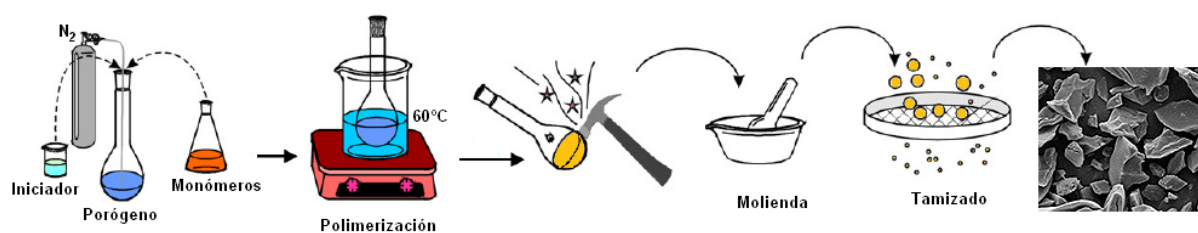


Figura 9. Esquema de una polimerización en disolución⁷⁵

A pesar de que la polimerización en disolución es un proceso sencillo con el que se obtienen polímeros libres de aditivos, la etapa de molienda y tamizado es laboriosa, tediosa y requiere grandes cantidades de disolventes. Es más, las partículas de polímero así obtenidas tienen formas y tamaños irregulares, por lo que no son ideales para su uso en cromatografía, al producir ensanchamiento de pico y sobrepresiones en el sistema cromatográfico⁵⁹.

Polimerización por precipitación. Este tipo de polimerización es particularmente útil y sencillo para obtener microesferas monodispersas sin usar ningún tipo de estabilizador estérico o electrostático. La metodología consiste básicamente en la polimerización de la mezcla de reacción en presencia de grandes cantidades de porógeno (entre 20-50 veces más que la cantidad que se utiliza en la polimerización en disolución). De ese modo, las cadenas de polímero son incapaces de ocupar todo el volumen del matraz de reacción y se produce una dispersión de micropartículas en el disolvente. Los monómeros son solubles en el disolvente pero al entrecruzarse y formar el polímero se vuelven insolubles, precipitando y dando así fin a la reacción. Una vez completada la polimerización, las partículas poliméricas se filtran y se lavan. En la **figura 10** se muestra el esquema básico de la polimerización por precipitación.

⁷⁵ Society for molecular imprinting, www.molecular-imprinting.org

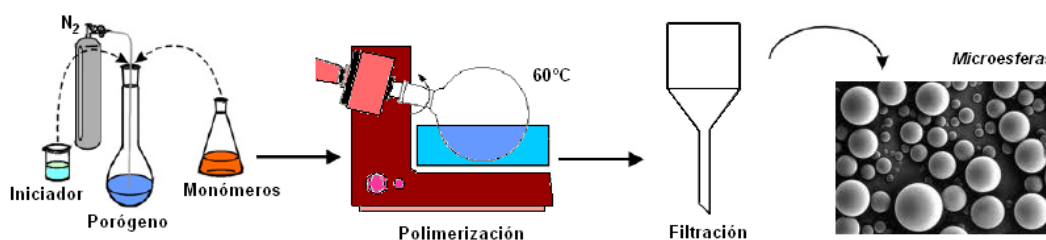


Figura 10. Esquema que representa una polimerización por precipitación

Una dilución grande de los reactivos y una agitación suave favorecen el crecimiento independiente de las partículas de polímero. Normalmente, el polímero así obtenido no necesita más tratamiento para poder usarse; las microesferas monodispersas (de distribución regular tanto en forma como en tamaño) son ideales para las aplicaciones cromatográficas⁵⁹.

2.2.3 Caracterización y evaluación de MIPs

Los MIPs son sólidos amorfos de gran diversidad estructural, químicamente heterogéneos e insolubles, por lo que su caracterización resulta complicada. No obstante, es posible realizar una caracterización correcta a tres niveles diferentes: caracterización de sus propiedades químicas, morfológicas y de su capacidad de reconocimiento molecular selectivo^{73,76}.

Caracterización química. Debido a su naturaleza insoluble, las técnicas aplicadas para su caracterización deben ser compatibles con muestras en estado sólido. Las aproximaciones analíticas habitualmente utilizadas para la caracterización química de un polímero se describen a continuación:

- *Análisis elemental.* Se utiliza como técnica de rutina para determinar el porcentaje en masa de carbono, hidrógeno, nitrógeno, etc. Se usa en el análisis de copolímeros para calcular la relación de los monómeros cuando uno de ellos incluye en su estructura heteroátomos, pero no ofrece sensibilidad suficiente para determinar cantidades traza de molécula molde que aún estén presentes en el MIP.
- *Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).* Al igual que el análisis elemental, *FTIR* proporciona información sobre la composición del polímero, ej. grupos funcionales. De manera limitada debido a que no tienen sensibilidad

⁷⁶ Sellergen, B., *Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2001.

suficiente, aporta información sobre la existencia de interacciones no covalentes como por ejemplo, puentes de hidrógeno.

- $^{13}\text{C-NMR}$ en estado sólido. Proporciona información sobre las distintas clases de átomos de carbono presentes en la red polimérica y determina el número de dobles enlaces que quedan sin reaccionar en el polímero (grado de curación). Es una técnica de reciente aplicación, poco utilizada y cara.

Caracterización morfológica. La mayoría de las técnicas aplicadas en el análisis morfológico de un MIP son aquellas ya establecidas para la caracterización de sólidos porosos. Según sea la técnica empleada, la información recogida permitirá determinar el volumen y el tamaño medio de los poros, su distribución y/o la superficie de área específica.

- *Penetrabilidad del disolvente.* Midiendo la cantidad de disolvente que puede penetrar en un polímero, se puede estimar el volumen específico de poro.
- *Porosimetría de adsorción de nitrógeno.* Consiste en exponer una masa fija de polímero seco a distintas presiones de nitrógeno; midiendo la cantidad de gas adsorbido en función de la presión, se pueden construir las isotermas de adsorción BET⁷⁷. Proporcionan información sobre el área de superficie específica, el volumen específico de poro, la distribución del tamaño de poros y el diámetro medio de poros. Esta técnica es particularmente adecuada para la evaluación de microporos (< 2nm) y mesoporos (2nm < 50 nm).
- *Porosimetría de intrusión de mercurio.* Consiste en forzar mediante presión la intrusión de mercurio en una masa fija de polímero seco. Proporciona la misma información que la anterior porosimetría, pero es más sensible para la evaluación de macroporos (> 50 nm).
- *Cromatografía de exclusión molecular inversa (ISEC).* Es una porosimetría por interacción sólido-líquido. Al contrario que las porosimetrías, la ISEC permite la evaluación de la estructura porosa de los polímeros cuando están húmedos, lo cual resulta de gran interés en lo que a los MIPs se refiere, ya que la mayoría de sus aplicaciones implican estar en contacto con disolventes. En esta técnica, el MIP se presenta como fase estacionaria sobre la que se separan cromatográficamente, a un flujo constante, polímeros solubles de distribución de pesos moleculares conocidos.
- *Microscopía.* La superficie del polímero puede evaluarse tanto mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) como mediante la microscopía de fuerza

⁷⁷ La teoría BET debe su nombre a las iniciales de los científicos que la usaron por primera vez: S. Brunauer, P.H. Emmett y E. Teller.

atómica (AFM). La SEM permite obtener información sobre la morfología de las partículas poliméricas y los macroporos superficiales. El proceso de preparación de muestras es simple, pero las muestras no son recuperables. La AFM proporciona un perfil tridimensional cuantitativo de la superficie del polímero, que permite diferenciar las fases cristalinas y amorfas; a pesar de ello, es una técnica poco utilizada.

Caracterización de los sitios de unión específica: evaluación de la selectividad de un MIP. Antes de su uso, los MIPs deben ser evaluados para comprobar sus propiedades de reconocimiento molecular frente al analito bajo estudio^{64,78}.

- *Cromatografía frontal.* Se emplea en el estudio de las interacciones molécula molde-MIP y para estimar las energías de adsorción y la capacidad de saturación del material. El MIP se empaqueta en una columna cromatográfica por la que se hace pasar continuamente una disolución de concentración conocida de la molécula molde. Conforme la molécula se une al MIP, el polímero se va saturando y la cantidad de soluto que eluye de la columna aumenta, dando un perfil de avance característico⁷⁹.
- *Cromatografía de elución.* Permite medir los factores de capacidad (k') y factores de impronta (IF) del MIP⁸⁰. Dichos valores se obtienen al comparar el tiempo de retención de la molécula molde en dos columnas cromatográficas, una empaquetada con en MIP y la otra con el NIP. Si el polímero está impreso, debido a las interacciones específicas, la molécula molde se retendrá más fuertemente en el MIP (mayores tiempos de retención) que en el NIP. También puede comprobarse la selectividad del MIP sobre la molécula molde inyectando compuestos relacionados estructuralmente.
- *Estudios de adsorción.* Los diferentes mecanismos de adsorción y retención de los compuestos en un MIP se suelen describir mediante la evaluación de su isoterma de adsorción, la cual permite obtener información sobre la selectividad, la constante de afinidad y la densidad de los sitios de unión.

La evaluación de las isotermas de adsorción se lleva a cabo realizando diferentes ensayos que determinan la cantidad de analito que se une al polímero al

⁷⁸ Caro, E., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., *Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples*, TrAC 2006, 25, 143-154.

⁷⁹ García-Calzón, J.A., Díaz-García, M.E., *Characterization of binding sites in molecularly imprinted polymers*, Sens. Actuators B 2007, 123, 1180-1194.

⁸⁰ Baggiani, C., Giraudi, G., Trotta, F., Giovannoli, C., Vanni, A., *Chromatographic characterization of a molecularly imprinted polymer binding cortisol*, Talanta 2000, 51, 71-75.

cargar concentraciones crecientes del mismo (*experimentos en "batch" o por lotes*). Los resultados experimentales obtenidos pueden ajustarse a diversos modelos matemáticos, que pueden dividirse en tres clases: modelos discretos, de distribución continua e híbridos. Los modelos discretos simplifican la distribución de afinidad en un número finito de sitios de unión con una afinidad diferente. Los modelos de distribución continua, sin embargo, consideran una función continua con un número infinito de sitios de unión para modelizar dicha distribución. En la **tabla 1** se recogen algunos de los modelos más utilizados.

Para seleccionar el modelo apropiado, se debe tener en cuenta que el sistema debe de estar termodinámicamente en equilibrio y no introducir parámetros suplementarios que alejen del significado químico del experimento.

Tabla 1. Modelos de isotermas de adsorción^{79,81}

Modelo isoterma		Fórmula
Distribución discreta	Lagmuir	$B = \frac{N_t K C}{1 + K C}$
	Bi-Lagmuir	$B = \frac{N_1 K_1 C}{1 + K_1 C} + \frac{N_2 K_2 C}{1 + K_2 C}$
	Jovanovic	$B = N_t (1 - e^{-K C})$
	Bi-Jovanovic	$B = N_1 (1 - e^{-K_1 C}) + N_2 (1 - e^{-K_2 C})$
Distribución continua	Freundlich	$B = a C^m$
Híbrida	Lagmuir- Freundlich	$B = \frac{N_t K^m C^m}{1 + K^m C^m}$
	Jovanovic- Freundlich	$B = N_t (1 - e^{-K C^m})$

En estas fórmulas, **B** representa la cantidad de analito unido al polímero, **C** es una medida de la cantidad de analito que permanece libre en la disolución, **N_t** corresponde a la densidad de sitios de unión presentes en la matriz polimérica, **a** es el parámetro de Freundlich, relacionado con la constante de afinidad media **K** a través de la fórmula $K=a/m$ y **m** es el índice de heterogeneidad que toma valores comprendidos entre 0, material heterogéneo, y 1, material homogéneo.

⁸¹ Baggiani, C., Giraudi, G., Giovannoli, C., Tozzi, C., Anfossi, L., *Adsorption isotherms of a molecular imprinted polymer prepared in the presence of a polymerisable template. Indirect evidence of the formation of template clusters in the binding site*, Anal. Chim. Acta 2004, 504, 43-52.

De todos estos modelos, el más sencillo es el de *Freundlich*, que describe una distribución continua de distintas clases de sitios de unión (útil en la descripción de materiales heterogéneos, donde los procesos de adsorción son generalmente a través de puntos de unión de baja afinidad). Los modelos de *Langmuir* y *Jovanovic* muestran una versión simplificada del comportamiento de los polímeros al considerar una única constante de afinidad y la ausencia de heterogeneidad en los sitios de unión, ajustándose bien al comportamiento de materiales homogéneos. Los modelos *Bi-Langmuir* y *Bi-Jovanovic*, describen un mecanismo de adsorción dual, con dos clases distintas de sitios de unión, de alta y de baja afinidad (en muchas ocasiones son una mejor aproximación que los modelos simples, donde sólo se considera un tipo de puntos de unión). Por último, existen modelos de ajuste basados en isothermas bi-modales, como el modelo de *Freundlich-Langmuir* y el de *Freundlich-Jovanovic*, que describen un mecanismo de unión híbrido entre la distribución continua de centros activos que postula el modelo de Freundlich y la homogeneidad propuesta por los modelos de Langmuir y Jovanovic. Con ellas se permite ajustar simultáneamente las regiones de saturación y no saturación de la isoterma de unión.

2.2.4 MIPs para extracciones en fase sólida

Uno de nuestros objetivos es el desarrollo de MIPs para su empleo como adsorbentes selectivos en procesos de extracción en fase sólida (MIP-SPE o MISPE) para la limpieza y/o preconcentración de muestras alimentarias. Debido a la alta selectividad que presentan la mayoría de los MIPs, como ya se ha puesto de manifiesto, su aplicación en técnicas de SPE permite la limpieza y enriquecimiento selectivo de analitos presentes en muestras complejas (la fuerte interacción entre el MIP y la molécula molde permite utilizar procedimientos de lavado exhaustivos con el fin de limpiar mejor las muestras antes del análisis, consiguiéndose mayor intensidad y menor relación señal-ruido en los análisis, así como elevados niveles de recuperación). Cabe destacar que en las aplicaciones analíticas de MISPE puede ser problemático usar directamente el analito de interés como molécula molde, ya que es difícil su eliminación total del MIP, pudiendo verse afectada la exactitud y la precisión de la medida analítica. Una posible solución es usar como molécula molde un análogo del analito.

Los procedimientos utilizados abarcan desde métodos de preconcentración en línea, hasta procedimientos en los que el MIP se incuba previamente con la muestra, pasando por preconcentraciones convencionales en cartuchos de SPE

Preconcentraciones convencionales en cartuchos de SPE. Si el polímero ha sido sintetizado mediante polimerización en disolución, éste debe triturarse y tamizarse hasta el tamaño de partícula deseado. Posteriormente, se extrae la molécula molde con el fin de liberar las cavidades formadas. Por último, se trasvasa una pequeña cantidad a un cartucho y se llevan a cabo las etapas características de un proceso de SPE. Estas etapas, que se muestran en la **figura 11**, incluyen: **1)** acondicionamiento previo del polímero con el disolvente en el que se va a cargar la muestra, **2)** carga de la muestra sobre el polímero y fijación selectiva de los analitos en las cavidades del mismo, **3)** lavado de los compuestos interferentes retenidos de manera inespecífica en el polímero y **4)** elución de los analitos con el disolvente adecuado.

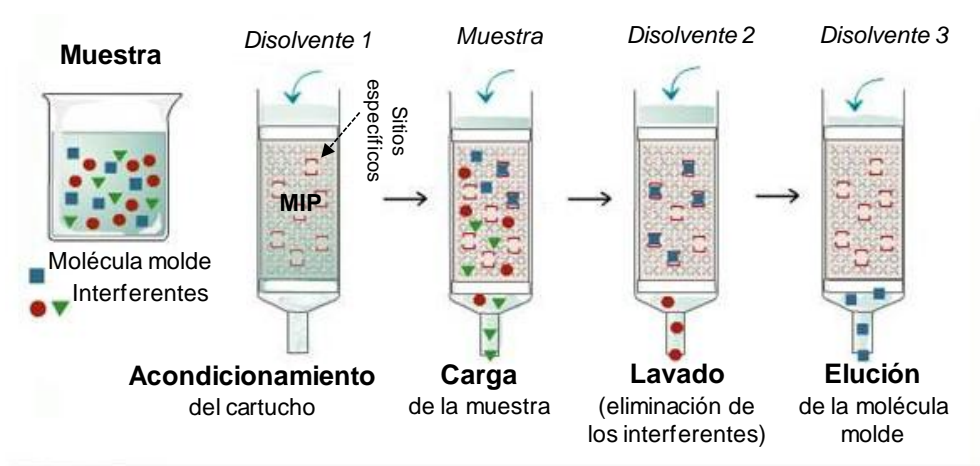


Figura 11. Etapas de un proceso de SPE usando un MIP como material adsorbente⁸²

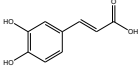
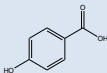
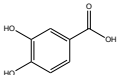

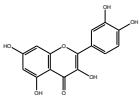
La elección del disolvente más adecuado para cada una de estas etapas debe basarse en la solubilidad de los analitos, el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero y en el porógeno empleado durante la polimerización. El disolvente más adecuado para efectuar la carga de la muestra será aquél que favorezca la interacción entre los analitos y el polímero, siendo el porógeno la primera opción a considerar. Por el contrario, el disolvente empleado en la elución se seleccionará en función de su facilidad para romper la interacción específica entre los analitos y el MIP.

En la actualidad, son muy numerosos los trabajos publicados de aplicaciones MISPE para la determinación de multitud de analitos en diversas muestras de distinta naturaleza. Sin embargo, hasta la fecha, el número de publicaciones que desarrollan MIPs para la extracción selectiva de compuestos fenólicos es muy limitado. En la **tabla 2** se muestran los artículos publicados que se han podido encontrar hasta la fecha sobre el desarrollo de

⁸² http://digilander.libero.it/Imprinted_Polymers/MIPs/recupero_intro.htm

MISPE para la extracción selectiva de ácidos fenólicos y flavonoides de diversas matrices vegetales. Todos los MIPs fueron sintetizados usando una polimerización en disolución.

Tabla 2. Publicaciones relativas al uso de MISPE para la extracción de compuestos fenólicos

Molécula molde	Condiciones de polimerización Monómero / entrecruzador / porógeno / iniciador	Matriz vegetal analizada
Ácido cafeico 	24h, 40°C VP / PETRA / THF / ABDV	Aguas residuales de la almazara ⁸³
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico 	24h, 40°C VP / PETRA / MeCN / ABDV	Aguas residuales de la almazara ⁸³
Ácido protocatechuico 	24 h, 60°C AA / EDMA / MeCN / AIBN	Melissa officinalis ^{84,85}
Vanillina 	24h, 60°C MAA / EDMA / MeOH / AIBN	Vanilla fragrans y cerveza ⁸⁶
Quercetina 	24 h, 60°C VP+MAA / EDMA / DMSO:MeCN 2:3 / AIBN	Vino blanco y tinto, zumo de naranja y té ⁸⁷
	12h, 60 °C VP / EDMA / acetone / AIBN	Vino ^{88,89}
	24 h, 60°C AA / EDMA / THF / AIBN	Hojas de ginkgo ⁹⁰ Caragana Jubata ⁹¹
	24 h, 60°C AA / EDMA / THF / AIBN	Cacumen Platycladi ⁹²

⁸³ Michailof, C., Manesiotis, P., Panayiotou, C., *Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive miss waste waters*, J. Chromatogr. A 2008, 1182, 25-33.

⁸⁴ Karasová, G., Lehotay, J., Sádecká, J., Skacáni, I., Lachová, M., *Selective extraction of derivates of p-hydroxybenzoic acid from plant material by using a molecularly imprinted polymer*, J. Sep. Sci. 2005, 28, 2468-2476.

⁸⁵ Karasová, G., Lehotay, J., *Comparison of several extraction methods for the isolation of benzoic acid derivatives from Melissa officinalis*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2006, 29, 1633-1644.

⁸⁶ Wang, G.S, Cao, Q.E. Xiong, J., Zhu, Xiu, X.F., Hou, N.B., Ding, Z.T., *Preparation and recognition properties of vanillin-imprinted polymers*, Helvetica Chimica Acta 2006, 89, 3032-30.40

⁸⁷ Theodoridis, G., Lasáková, M., Skeríková, V., Tegou, A., Giantsiou, N., Jandera, P., *Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: application in solid-phase extraction for the sample pre-treatment of natural products prior to HPLC analysis*, J. Sep. Sci. 2006, 29, 2310-2321.

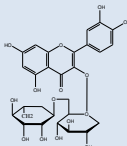
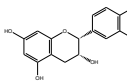
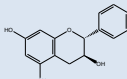
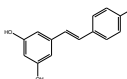
⁸⁸ Weiss, R., Molinelli, A., Jakusch, M., Mizaikoff, B., *Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compound*, Bioseparation 2002, 10, 379-387.

⁸⁹ Molinelli, A., Weiss, R., Mizaikoff, B., *Advanced solid phase extraction using molecularly imprinted polymers for the determination of quercetin in red wine*, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 1804-1808.

⁹⁰ Xie, J., Zhu, L., Luo, H., Zhou, L., Li, C., Xu X., *Direct extraction of specific pharmacophoric flavonoides from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin*, J. Chromatogr. A 2001, 934, 1-11.

⁹¹ Zhu, L., Xu, X., *Selective separation of active inhibitors of epidermal growth factor receptor from Caragana Jubata by molecularly imprinted solid-phase extraction*, J. Chromatogr. A 2003, 991, 151-158.

⁹² Song, X, Li, J., Wang, J., Chen, L., *Quercetin molecularly imprinted polymers: preparation, recognition characteristics and properties as sobent for solid-phase extraction*, Talanta 2009, 80, 694-702.

Rutina		24 h, 60°C VP+MAA / EDMA / DMSO:DMF 3:1/AIBN /	Vino blanco y tinto, zumo de naranja y té ⁹⁰
Epicatequina		12h, 60 °C AA / EDMA / Acetona / AIBN	Té ⁹³
Catequina		24h, 60 °C AA / EDMA / MeCN / AIBN	Té verde ⁹⁴
Resveratrol		24h, luz UV, 4°C AA / EDMA / MeCN / AIBN	Polygonum cuspidatum ⁹⁵

Abreviaturas: VP, 4-Vinilpiridina; AA, acrilamida; ABDV, 2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilo); AIBN, 2,2'-azobis (isobutironitrilo); DMF, 2,5-dimetilfurano; DMSO, dimetilsulfóxido; EDMA, etilenglicol dimetacrilato; MAA, ácido metacrílico; MeCN, acetonitrilo; MeOH, metanol; PETRA, (2Z)-N,N'-bis(2-aminoetilic)but-2-enediamida; THF, tetrahidrofurano.

2.3 Técnicas separativas

Como ya se ha indicado, llevar a cabo la identificación individual de cada uno de los compuestos de una muestra obliga al uso de técnicas separativas. Las técnicas más utilizadas en la determinación de compuestos fenólicos en muestras de alimentos son:

❖ **Electroforesis capilar (CE).** Es una técnica muy versátil basada en la migración electroforética de los analitos cargados en columnas capilares de pequeño diámetro interno. El enorme interés que ha despertado en los últimos años se debe a las enormes posibilidades que presenta⁹⁶. En general suele proporcionar información complementaria a la obtenida por las técnicas cromatográficas, al ser el principio de separación en el cual se basa completamente diferente.

❖ **Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** Actualmente la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) es el modo cromatográfico más ampliamente utilizado para la separación y caracterización de compuestos fenólicos en cualquier muestra.

⁹³ Ding, L., Li, H., Tang, F., Yao, S., *Molecularly imprinted solid-phase extraction of epicatechin from tea beverage*, Anal. Lett. 2006, 39, 2373-2385.

⁹⁴ Blahová, E., Lehotay, J., Skačani, I., *The use of molecularly imprinted polymer for selective extraction of (+)-catechin*, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2005, 27, 2715-2731.

⁹⁵ Cao H, Xiao JB, Xu M, *Evaluation of new selective molecularly imprinted polymers for the extraction of resveratrol from Polygonum Cuspidatum*, Macromol. Res. 2006, 14, 324-330.

⁹⁶ Camilleri, P., *Capillary electrophoresis: a major advancement in separation technology*, Chem. Commun. 1996, 49, 1851-1858.

❖ **Cromatografía de gases (GC).** La GC es ampliamente empleada en la detección de ácidos fenólicos y otros compuestos fenólicos en plantas. La preparación de muestra suele englobar la eliminación de lípidos del extracto, hidrólisis y/o derivatización, además de la extracción, purificación y limpieza^{45,46}. El uso de nuevas columnas que soportan temperaturas aún más elevadas, nuevos controladores electrónicos de presión y detectores han posibilitado una mejora significativa en la resolución y un incremento del rango superior de pesos moleculares que pueden ser analizados por GC²¹.

❖ **Cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC).** La HSCCC o cromatografía de partición centrífuga es una técnica cromatográfica relativamente nueva y la forma más avanzada de CCC en términos de eficacia de partición y tiempo de separación. La separación está basada en la partición de los compuestos entre dos líquidos inmiscibles, pero en este caso, está ayudada por la presión y la fuerza centrífuga, mezclando vigorosamente las dos fases líquidas inmiscibles. Al no emplear fase estacionaria sólida, la HSCCC posee una serie de ventajas: no hay pérdidas irrecuperables de analitos en el soporte sólido, fácil ampliación del sistema de fraccionamiento (simplemente cambiando la longitud de la tubería en espiral) y bajo coste (al no requerir adsorbentes o columnas caras)⁵⁵.

❖ **Cromatografía convencional.** La cromatografía en papel (PC), en columna (CC) y, sobre todo, la cromatografía en capa fina (TLC) se han usado para la separación de compuestos fenólicos aunque, debido a su limitada capacidad de separación, sensibilidad y resolución, a la cantidad de muestra requerida y a las dificultades en la detección y cuantificación, se utilizan cada vez menos. Hoy día, se emplean fundamentalmente para el fraccionamiento o separación preliminar de fitoquímicos antes de su análisis por técnicas instrumentales⁵⁵.

En el trabajo experimental se han desarrollado métodos separativos utilizando CE y HPLC, por lo que a continuación se explicarán en detalle los fundamentos y características de ambas técnicas.

2.4 Electroforesis capilar (CE)

2.4.1 Definición, conceptos básicos e instrumentación

La CE es una técnica de separación en la que las sustancias en solución se separan en función de su diferente movilidad, en sentido y velocidad, bajo la acción de un campo

eléctrico. La separación se lleva a cabo en el interior de un capilar lleno de una disolución tampón (denominado electrolito de separación o medio electroforético)⁹⁷.

Las principales características de la CE son⁹⁸:

- Elevada rapidez de análisis.
- Elevadas eficacias.
- Requerimiento de pequeños volúmenes de muestra (del orden de nl) y de reactivos (del orden de ml).
- Gran variedad de aplicaciones debido a las distintas modalidades existentes, permitiendo la separación desde pequeños iones hasta células.
- Facilidad de automatización.

Estas características han hecho que su empleo sea cada vez más generalizado en los laboratorios de análisis, existiendo en la actualidad una variada oferta de aparatos comerciales en el mercado.

La CE es similar a la cromatografía en muchos aspectos y algunos de los términos básicos se pueden usar indistintamente en las dos técnicas, p. ej. resolución y eficacia (la descripción de los términos empleados en cromatografía se encuentra el apartado 2.5.2). No obstante, gran parte de la terminología empleada para CE es diferente, como se muestra en la siguiente tabla⁹⁹.

Tabla 3. Comparación de los términos empleados en CE y en cromatografía

	CE	Cromatografía
	Electroferograma	Cromatograma
	Potencial aplicado	Flujo
	Electrolito de separación, tampón o buffer	Fase móvil o eluente
	Modo de inyección	Sistema de inyección
	Tiempo de migración	Tiempo de retención
	Movilidad electroforética	Factor de capacidad
	Flujo electroosmótico	-
	Fuente de alto voltaje	Bomba
	Capilar	Columna

La CE ofrece la ventaja de que el desarrollo de los métodos es mucho más predecible que en HPLC; la migración electroforética sigue unas reglas concretas y simples, mientras que las interacciones moleculares en HPLC son mucho más complejas. La CE es

⁹⁷ Cruces-Blanco, C., *Electroforesis capilar*, Ed. Univ. Almería, Servicio Publicaciones Almería, 1998.

⁹⁸ Dabrio, M.V., Blanch, G.P., Cifuentes, A., Díez-Masa, J.C., de Frutos, M., Herraiz, M., Martínez de Castro, I., Sanz Perucha, J., *Cromatografía y electroforesis en columna*, Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 2000.

⁹⁹ Weston, A., Brown, P.R., *HPLC and CE: principles and practice*, Academic Press, San Diego, 1997.

más eficaz (debido al perfil plano del flujo del tampón), necesita menos cantidad de disolventes y es más rápida, pero la reproducibilidad en el análisis es peor. Como conclusión se puede decir que ambas técnicas son complementarias al basarse en mecanismos de separación diferentes⁹⁸.

En la **figura 12** se muestra un esquema de la instrumentación básica requerida en CE, que consta de las siguientes partes: generador de alto voltaje (que permite establecer diferencias de potencial de decenas de kV entre los extremos del capilar), viales fuente y destino que contienen el electrolito de separación y otro vial que contiene la muestra, sistema de inyección de la muestra, capilar (parte fundamental del sistema ya que en su interior se produce la separación), sistema de termostatación para controlar la temperatura del capilar, sistema de detección y sistema de registro que trata la señal eléctrica generada en el detector.

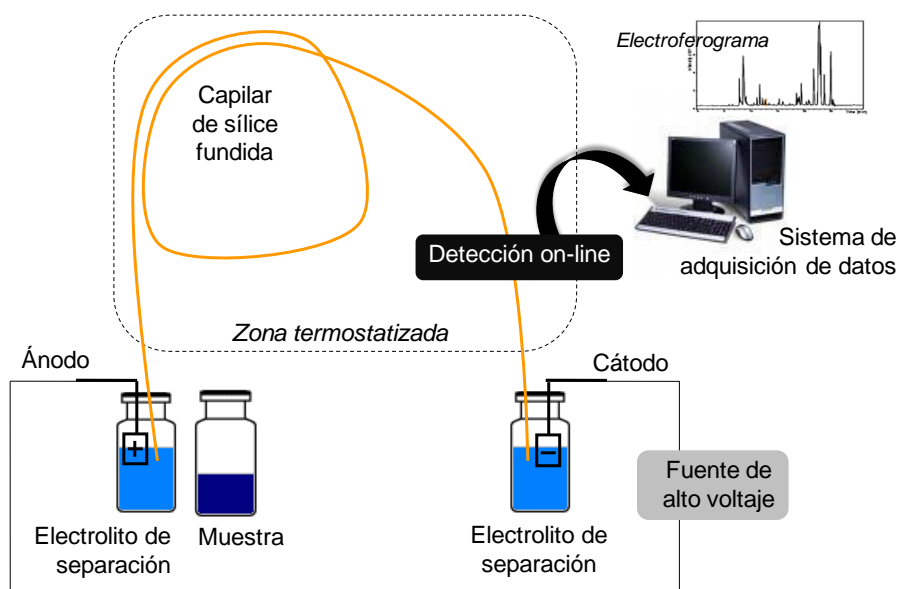


Figura 12. Esquema básico de un instrumento de CE¹⁰⁰

Los capilares que se utilizan para llevar a cabo las separaciones son normalmente de sílice fundida, con un recubrimiento externo de poliimida para darle flexibilidad y resistencia, permitiendo un fácil manejo sin peligro de rotura. La sílice fundida es totalmente compatible con la detección espectrofotométrica UV-Vis, ya que es transparente a la radiación en dicha zona del espectro. Por otro lado, la elevada relación superficie externa/volumen interno del capilar favorece la disipación de calor generado por efecto

¹⁰⁰ Simó-Ruiz, C., Tesis Doctoral: *Nuevas aplicaciones del acoplamiento electroforesis capilar-espectrometría de masas en el análisis de alimentos*, Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC, Madrid, 2005.

Joule inducido por la aplicación de voltaje. Las dimensiones del capilar oscilan entre 10-100 cm de longitud y 25-100 μm de diámetro interno⁹⁸.

Los extremos del capilar se colocan en dos viales (fuente y destino) rellenos del electrolito de separación y conteniendo un electrodo cada uno de ellos, ambos conectados a una fuente de alto voltaje. La muestra se inyecta dentro del capilar, sustituyendo temporalmente el vial inicial (el del ánodo, si se trabaja con polaridad normal) por un vial que contiene la muestra a separar, aplicando durante unos segundos un potencial eléctrico (inyección electrocinética) o una presión externa (inyección hidrodinámica). Después se vuelve a reemplazar el vial muestra por el inicial y se aplica un potencial eléctrico a lo largo del capilar. Los analitos se separan según migran por el capilar y pueden ser detectados con detección óptica (UV-Vis, fluorimétrica, fosforimétrica, quimioluminiscente o infrarroja) a través de la ventana del capilar, que habitualmente se encuentra cerca del extremo opuesto a donde se hizo la inyección, cerca del cátodo (detección on-line), o al final del capilar mediante el uso de otros sistemas de detección como la espectrometría de masas o las técnicas eléctricas (detección off-line). Los datos que produce el detector se procesan en un ordenador donde aparecen como un electroferograma (respuesta del detector frente al tiempo)¹⁰¹.

2.4.2 Fundamentos de la separación

La migración de las especies en el interior del capilar, sometido a un campo eléctrico constante, se rige por dos fenómenos que tienen lugar simultáneamente, la electromigración y la electroósmosis^{97,102,103}.

La **electromigración**, o flujo electroforético, afecta a las especies cargadas, y hace que los analitos en el interior del capilar tiendan a migrar hacia el polo opuesto (cationes al cátodo, aniones al ánodo) a distinta velocidad.

Durante la separación, los iones se ven sometidos a la fuerza generada por el campo eléctrico $F = qE$ y a una fuerza de rozamiento $F' = 6\pi\eta r v_e$ que se opone a la eléctrica, siendo q la carga del ión, E el campo eléctrico aplicado, η la viscosidad de la disolución de separación, r el radio de la partícula o ión en disolución y v_e la velocidad de

¹⁰¹ Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., *Electroforesis capilar: aproximación según la técnica de detección*, Ed. Universidad de Granada, 2005.

¹⁰² Landers, J.P., *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, U.S., 1997.

¹⁰³ Marina, M.L., Ríos, A., Valcárcel, M., *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, 2005.

migración de cada ión. Durante la separación, ambas fuerzas se igualan ($F = F$), de modo que los iones adoptan un movimiento rectilíneo uniforme, cuya velocidad de migración viene expresada como:

$$v_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} = \mu_{ef} E$$

Ésta es una expresión del balance de fuerzas que actúan sobre cada ión individual; la fuerza del campo eléctrico actúa a favor del movimiento y las fuerzas de fricción y rozamiento, en contra. Puesto que estas fuerzas son constantes durante la electroforesis, la movilidad electroforética es una constante para un ión dado bajo unas condiciones dadas.

La magnitud que resulta de esta ecuación es la denominada *movilidad electroforética* $\mu_{ef} = q/(6\pi\eta r)$, parámetro que gobierna la selectividad del sistema de separación y que indica cómo de rápido se mueve un ión o soluto a través de la disolución de separación. Como se observa en la ecuación, la movilidad electroforética de un soluto (μ_{ef}) es función de su relación carga radio (q/r) y de la viscosidad del medio (η), por tanto dependen de la naturaleza y la concentración del electrolito de separación y de la temperatura.

Las diferencias en las movilidades electroforéticas se van a deber a las diferencias en la relación carga/tamaño de ión. Las moléculas pequeñas de gran carga se moverán más rápido a través del capilar que las moléculas con menor carga. Con esta expresión se deduce también que las moléculas neutras, al ser $q=0$, tendrán una movilidad electroforética igual a cero. En la **figura 13** se observa cómo las especies altamente cargadas y de pequeño radio tienen las movilidades más elevadas.

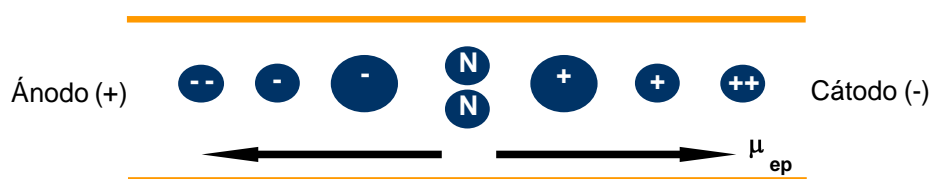


Figura 13. Electromigración de las especies cargadas

La segunda fuerza que rige la migración de las especies es la **electroósmosis**, fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida). La pared interna del capilar tiene grupos silanoles (SiOH) que, en contacto con el tampón de separación, se ionizan (SiO^-). Su grado de ionización se controla principalmente mediante el pH del electrolito de separación (aparecen cargas negativas con disoluciones de pH superior a 2.5-3). De este modo, la pared cargada negativamente atrae a los iones con carga positiva del tampón creando una

doble capa eléctrica. En la capa compacta próxima a la pared del capilar las interacciones que se dan entre los grupos cargados negativamente de la sílice y los contraiones del tampón son tan grandes que compensan la agitación térmica; en la otra capa más alejada de la pared (capa difusa) estas interacciones son más débiles, pudiéndose producir agitación térmica. Bajo la acción del campo eléctrico, las cargas positivas de la capa difusa se desplazan hacia el cátodo y arrastran con ellas el agua de solvatación asociada, originando un movimiento global de todas las especies en el interior del capilar (**fig. 14**), denominado *flujo electroosmótico* (EOF).

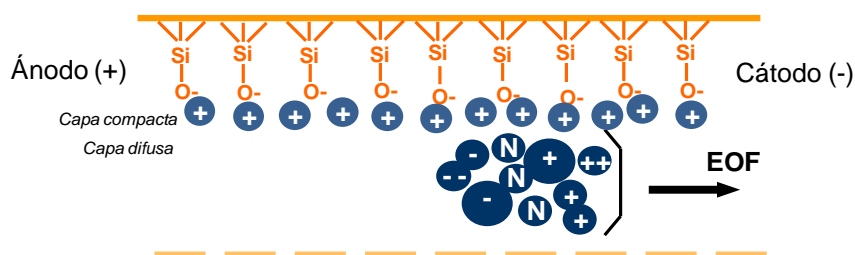


Figura 14. Interior de un capilar de sílice en presencia de un electrolito de separación y migración de las especies por electroósmosis

El EOF, viene determinado por su *velocidad electroosmótica*, $v_{eo} = \mu_{eo} E$, donde μ_{eo} es la *movilidad electroosmótica* definida como:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4\pi\eta}$$

siendo ε la constante dieléctrica del tampón, η su viscosidad y ζ el potencial que se genera aproximadamente entre la superficie del capilar y el tampón (potencial zeta). Al tratarse de una propiedad del sistema capilar-tampón, el EOF afecta del mismo modo a todas las sustancias en el interior del capilar y tiene un perfil prácticamente plano, lo que hace posible la obtención de elevadas eficacias.

El movimiento efectivo viene determinado por la *movilidad aparente* y la velocidad que van a adoptar las sustancias dentro del capilar va a ser suma (o resta, dependiendo de las condiciones de separación y de los analitos) de la velocidad electroosmótica y electroforética:

$$v = (\mu_{eo} \pm \mu_{ef}) E$$

2.4.3 Modos de separación en CE

Una de las características más importantes de la CE es su versatilidad, y esto es causado en parte por los distintos modos de separación disponibles. En la **tabla 4** se resumen los modos de CE más comunes, junto con el principio de separación de cada uno de ellos^{101,103}.

Tabla 4. Modos de separación en electroforesis capilar

Modo de separación	Acrónimo	Principio de separación
Electroforesis capilar en zona	CZE	Carga/tamaño
Cromatografía capilar electrocinética micelar	MEKC	Interacción hidrofóbica/iónica con micelas del surfactante
Electroforesis capilar quiral	CCE	Formación de complejos estereoespecíficos
Electroforesis capilar por afinidad	CAE	Interacciones moleculares entre ligando y analito "objetivo"
Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones	MEEKC	Mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico
Electroforesis capilar en gel	CGE	Tamaño molecular
Isoelectroenfoque capilar	CIEF	Punto isoelectrico
Isotacoforesis capilar	CITP	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza
Electrocromatografía capilar	CEC	Movilidad en una solución libre y retención cromatográfica

Los modos electroforéticos son complementarios entre sí, y una separación puede incluso realizarse satisfactoriamente por más de un modo. Además, y a diferencia de la cromatografía líquida donde el cambio de un modo a otro suele requerir el cambio de columna y fase móvil, en CE suele implicar únicamente el cambio de la composición de la disolución reguladora empleada, por lo que, a efectos prácticos, dos modos electroforéticos pueden ser utilizados en análisis sucesivos usando el mismo capilar.

Los modos más usados en el análisis de polifenoles son la CZE, que separa los compuestos según su relación carga/masa, seguida de la MEKC, en la que se añaden surfactantes a la disolución reguladora haciendo posible separar entre sí los compuestos neutros. El método puesto a punto en el trabajo que se recoge en esta memoria ha sido utilizando la modalidad de CZE.

2.4.3.1 Electroforesis capilar en zona (CZE)

La electroforesis capilar en zona, denominada también electroforesis capilar en zona libre, es el más versátil y simple de los modos en CE. Fue la primera modalidad que se desarrolló, merced a los trabajos pioneros de Jorgenson y Lukacs^{104,105} y continúa siendo la más utilizada, con un gran número de aplicaciones en diferentes campos.

En el interior del capilar sólo se encuentra el tampón que se emplea para llevar a cabo el análisis, de modo que, una vez inyectada la muestra, la separación se basa en las diferencias en la relación carga/masa de las distintas sustancias que componen la muestra. Estas diferencias implican distintas movilidades electroforéticas y, por tanto, diferentes velocidades de migración, permitiendo la separación de las especies cargadas, pero no de las neutras, que saldrán todas al mismo tiempo. Puesto que las muestras son introducidas normalmente desde el ánodo y el detector se encuentra al lado del cátodo el orden de elución es: cationes, sustancias neutras y aniones (*fig. 15*).

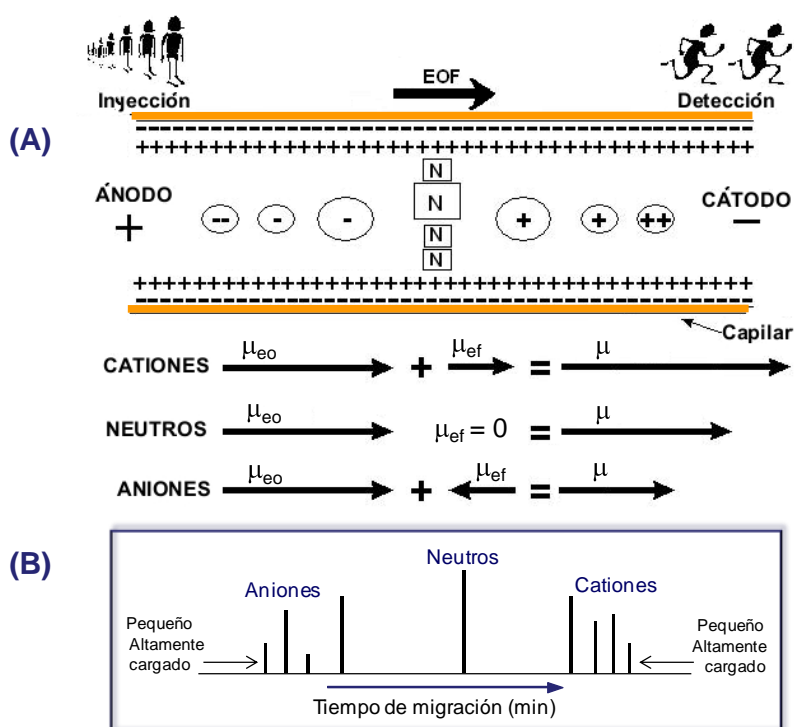


Figura 15. (A) Representación esquemática del interior de un capilar en el que se lleva a cabo una separación empleando CZE¹⁰⁶ y (B) de un electroferograma indicando el orden de elución de los analitos.

(EOF, flujo electrosmótico; μ_{ef} , movilidad electroforética; μ_{eo} , movilidad electrosmótica; μ , movilidad aparente)

¹⁰⁴ Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries*, Anal. Chem. 1981, 53, 1298-1302.

¹⁰⁵ Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Capillary zone electrophoresis*, Science 1983, 222, 266-272.

¹⁰⁶ The Swiss Laboratory for Doping Analyses, [http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-prestations-laboratoire-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm](http://www.doping.chuv.ch/en/lad_home/lad-prestations-laboratoire/lad-prestations-laboratoire-appareils/lad-prestations-laboratoire-appareils-ec.htm)

El hecho de que éste sea el orden de elución se debe a que los cationes se mueven a través del capilar en la misma dirección que el EOF, por lo que sus velocidades de migración serán más rápidas que el propio EOF. Las moléculas neutras, que se mueven a través del capilar empujadas sólo por el EOF, eluyen después de los cationes, pero sin separarse. Los aniones, finalmente, al poseer carga negativa, tenderán a moverse hacia el ánodo en sentido opuesto al EOF, pero generalmente éste es mayor que las velocidades electroforéticas de los aniones, por lo que los aniones se desplazan hacia el cátodo eluyendo en último lugar. Un esquema de lo que sería una separación CZE se representa en la **figura 15**.

2.4.4 Desarrollo de un método en CE

Los pasos típicos para el desarrollo de un método en CE son básicamente los mismos que para HPLC (ver apartado 2.5.4). Las variables a optimizar en el desarrollo del método son, sin embargo, diferentes y pueden dividirse en dos grandes grupos: variables instrumentales y variables químicas^{99,101,102,107,108}. El valor óptimo de estas variables será el que proporcione la máxima resolución entre los picos y la mejor sensibilidad, o en su defecto un compromiso entre ambas propiedades analíticas.

Variables instrumentales

➤ *Selección del capilar: dimensiones y acondicionamiento.* La longitud del capilar está relacionada con la resolución entre picos y el tiempo de separación, ya que, cuanto más largo sea un capilar, mayor es el tiempo de análisis y mayor la separación o resolución entre picos. Hay que diferenciar entre longitud efectiva (distancia entre los puntos de inyección y detección) y la longitud total (distancia entre los extremos del capilar).

El diámetro interno afecta a la sensibilidad del método; si no se requiere mucha sensibilidad es aconsejable usar capilares de 50 μm , ya que los problemas de calentamiento interno aumentan con el diámetro del capilar. El diámetro interno también afecta a los tiempos de migración, ya que cuanto mayor es el diámetro interno, mayor es la diferencia de temperatura entre el centro y la pared del capilar.

¹⁰⁷ Frazier, R.A., Ames, J.M., Nursten, H.E., *Capillary electrophoresis for food analysis method development*, RSC, Cambridge, 2000.

¹⁰⁸ Li, P., Li, S.P., Wang, Y.T., *Optimization of CZE for analysis of phytochemical bioactive compounds*, *Electrophoresis* 2006, 27, 4808-4819.

También es importante optimizar el ciclo de lavado y acondicionamiento del capilar para obtener unos resultados reproducibles, siendo lo más común un acondicionamiento en base al principio de cada análisis. Un ciclo típico de lavado puede ser agua-hidróxido sódico-agua-tampón, variando el tiempo que cada disolución pasa por el capilar en función del tampón y de la matriz analizada.

➤ *Voltaje.* La fuerza del campo eléctrico aplicada al capilar es el “motor” de la separación. Tanto la velocidad electroforética como la electroosmótica son directamente proporcionales al campo eléctrico, por lo que un aumento del voltaje aplicado proporcionará tiempos de migración cortos. No obstante, a altos voltajes también se pueden producir pérdidas en la resolución y eficacia de los picos, ya que la generación de calor excesivo dentro del capilar por el efecto Joule contribuye significativamente a la dispersión de los analitos y, por tanto, al solapamiento de los picos. En la práctica, en la mayoría de los equipos comerciales el voltaje límite que se puede emplear es de 30 kV.

➤ *Temperatura.* El control de la temperatura es importante para evitar el efecto Joule; si el calor no se disipa al mismo tiempo que se produce, la temperatura dentro del capilar aumentaría y la disolución de separación podría hervir, apareciendo burbujas dentro del capilar que podrían interrumpir el paso de corriente. Además, los cambios en la temperatura afectan a la movilidad de los analitos y al EOF; el uso de temperaturas altas disminuye el tiempo de análisis y mejora la forma de los picos debido a la disminución de la viscosidad, pero también se pierde resolución, en especial cuando se trata de analitos muy semejantes o de un número elevado de ellos. La mayoría de los instrumentos comerciales de CE permiten la termostatación del capilar en el intervalo de temperatura entre 10 y 50 °C.

➤ *Tipo y tiempo de inyección.* La muestra se puede introducir en el capilar usando dos modalidades, la hidrostática o hidrodinámica y la electrocinética. La inyección hidrodinámica es la más usada y se puede realizar elevando el vial a una altura determinada por encima del nivel inicial (gravedad), aplicando presión al vial de muestra (presión) o haciendo el vacío en el vial de salida. La inyección electrocinética consiste en colocar el capilar y el ánodo dentro del recipiente con la muestra y aplicar un voltaje pequeño (1-5 kV) durante un corto periodo de tiempo (1-10s) haciendo migrar los componentes de la muestra dentro del capilar.

El tiempo de inyección debe ser la última variable experimental a optimizar en un método. Se usará mayor o menor tiempo en función de la sensibilidad y la resolución que se quiera conseguir (mayor tiempo de inyección, mayor sensibilidad).

Variables químicas. Las características del electrolito de separación juegan un papel decisivo en la separación electroforética. En general, se emplean disoluciones reguladoras, dada la decisiva influencia del pH, y su elección depende del pH requerido para la separación de los analitos. Además del pH, deben tenerse en cuenta otros aspectos de la disolución de separación como la capacidad reguladora o la fuerza iónica.

➤ *pH.* Es una variable que afecta enormemente a la selectividad de los métodos electroforéticos, pues influye en el grado de ionización de especies ácidas o básicas débiles, y por tanto, en sus movilidades electroforéticas. En teoría, a medida que aumenta el pH aumenta la movilidad electroosmótica debido a que elevados valores de pH producen más disociación de los grupos silanoles dentro de las paredes del capilar, aumentando el potencial zeta y consecuentemente la velocidad electroosmótica. En general, para la separación de solutos catiónicos se debe trabajar a un pH de una o más unidades por debajo de su pK_b y para solutos aniónicos por encima de su pK_a .

➤ *Capacidad reguladora y composición.* La capacidad reguladora debe ser alta, sin un aumento excesivo de la conductividad en una zona lo más amplia posible de pH, para que se obtenga buena reproducibilidad y una baja fuerza iónica para minimizar el efecto Joule. Hay que tener en cuenta que esta capacidad reguladora disminuye 10 veces por cada unidad de pH que se desplace de su máximo ($pH=pK_a$). La elección es generalmente empírica. Normalmente en electroforesis capilar con detección UV-Vis se utilizan mayoritariamente electrolitos del tipo borato, y fosfato, y en algunos casos aditivos. Si el sistema de detección es la MS, estos compuestos van a originar un aumento significativo del ruido y, en condiciones extremas, la obstrucción y/o contaminación del espectrómetro. Además, las sales de metales alcalinos pueden dar lugar a la formación de aductos con los analitos en la fuente de ionización, reduciendo la sensibilidad. Por tanto, se puede decir, de forma muy general, que el uso de medios de separación volátiles con una fuerza iónica entre baja y media proporciona los mejores resultados en el acoplamiento CE-ESI-MS.

➤ *Fuerza iónica.* Tiene una influencia decisiva en las movilidades electroforéticas y electroosmóticas. Normalmente al aumentar la concentración de la disolución de separación aumenta el número de platos teóricos, mejorando la resolución de los analitos y su forma de pico. Sin embargo, aumenta el tiempo de análisis y se genera más calor dentro del capilar y es necesario un buen sistema

para regular la temperatura; capilares de pequeño diámetro permiten el uso de fuerzas iónicas más elevadas.

➤ *Presencia de aditivos.* Normalmente, la variación de las propiedades del tampón ya mencionadas es suficiente para lograr una buena separación, pero en ocasiones es necesario manipular el tampón usando aditivos (o modificadores). La adición de disolventes orgánicos miscibles (acetonitrilo, metanol o alcoholes de mayor peso molecular como glicerina o propanol) puede modificar la polaridad y viscosidad de la disolución de separación, cambiando las movilidades electroforéticas y electroosmóticas de los analitos. También pueden adicionarse sustancias poliméricas solubles (metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa) para reducir el potencial zeta de la pared interna del capilar, y por tanto minimizar el efecto de la electroósmosis y reducir significativamente los fenómenos indeseables de adsorción. Otro ejemplo, es el empleo de micelas surfactantes de cadena larga, que proporciona un mecanismo secundario de separación además de la movilidad electroforética. La adición de micelas, como se mencionó antes, da lugar a otro modo de separación en CE denominado MEKC.

2.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.5.1 Definición y tipos de cromatografía líquida

Se trata de una técnica de separación en la que la mezcla a resolver se introduce en un sistema formado por un fluido (fase móvil), que circula en íntimo contacto con una fase que permanece fija o inmóvil durante el proceso (fase estacionaria). En el caso de la cromatografía líquida, la fase estacionaria es un sólido o un líquido fijado en un sólido y la fase móvil es un líquido. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la mezcla se distribuyan de distinto modo entre la fase móvil y la estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la mezcla se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cuali- y/o cuantitativamente^{98,109}.

¹⁰⁹ Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Principios de análisis instrumental*, 5ª Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España S.A.U. Madrid, 2001.

Los métodos en cromatografía líquida pueden clasificarse atendiendo a varios criterios⁹⁸:

A. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria y del mecanismo de retención, encontramos los siguientes tipos (**fig. 16**):

A1. *Cromatografía de partición o de reparto.* La fase estacionaria es un líquido retenido por un sólido soporte y el mecanismo de separación predominante es el reparto. Es el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado y el empleado para desarrollar el trabajo experimental en dos capítulos de esta tesis.

A2. Si la fase estacionaria es un sólido, cabe la posibilidad de varios mecanismos:

- ♦ *Cromatografía de adsorción.* Se basa en la distinta magnitud de las interacciones de los componentes de la mezcla con la superficie activa de la fase estacionaria.
- ♦ *Cromatografía de intercambio iónico.* La fase estacionaria es un sólido con capacidad para intercambiar iones con la fase móvil.
- ♦ *Cromatografía de exclusión molecular.* La fase estacionaria es un sólido reticular o gel con tamaños de redícula del mismo orden que las moléculas a separar. Estas moléculas serán capaces de penetrar en más o menos huecos según su tamaño, forma, cargas eléctricas, etc.
- ♦ *Cromatografía de afinidad.* Se utiliza como mecanismo de separación una interacción específica entre el analito y la fase estacionaria. Si la interacción es de tipo biológico, será cromatografía de *bioafinidad*.

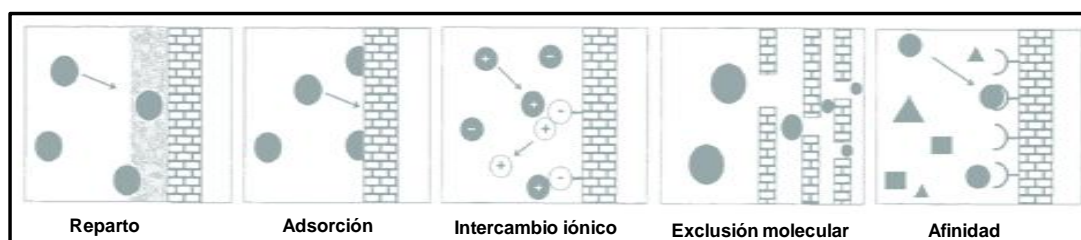


Figura 16. Representación visual de los modos de cromatografía según el mecanismo de separación¹¹⁰

En general, podemos decir que la cromatografía de partición o reparto se aplica a compuestos polares no iónicos; la cromatografía de adsorción separa especies no polares, isómeros e hidrocarburos alifáticos; la cromatografía de intercambio iónico permite analizar compuestos iónicos de peso molecular bajo; los analitos de peso molecular superior a 10.000 se separan mediante cromatografía de filtración sobre gel (de exclusión).

¹¹⁰ Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R. *Instrumental methods in food analysis*, Elsevier, Amsterdam, 1997.

B. La cromatografía también puede clasificarse de acuerdo con la forma de desarrollar el proceso cromatográfico (**fig. 17**):

- B1.** *Cromatografía frontal.* Se introduce la muestra de forma continua en el sistema, constituyendo ella misma la fase móvil.
- B2.** *Cromatografía de desplazamiento.* La fase móvil contiene un componente más afín a la fase estacionaria que los componentes de la muestra y es capaz de desplazarlos de ella.
- B3.** *Cromatografía de elución.* La muestra se introduce en un momento determinado y la fase móvil circula continuamente. Los componentes de la muestra salen de la columna como zonas, que en el caso ideal presentan una distribución gaussiana de concentración y están separadas unas de otras.

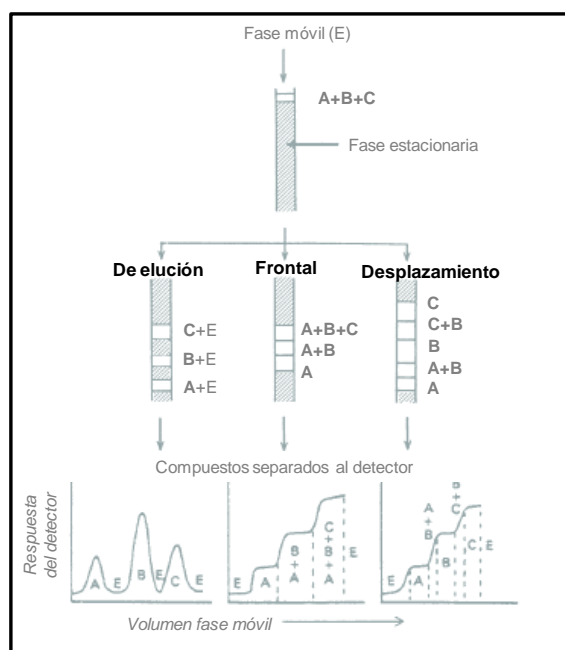


Figura 17. Clasificación de los métodos cromatográficos según el modo de operación¹¹¹

La cromatografía de elución puede clasificarse según la “continuidad” de la fase móvil:

- *Elución isocrática.* Durante todo el proceso (introducción de la muestra y elución de la columna) se utiliza la misma fase móvil. Se emplea cuando los compuestos tienen afinidades muy similares por la fase estacionaria.
- *Elución en gradiente.* La composición de la fase móvil cambia durante el desarrollo de la cromatografía. La fuerza eluyente de la fase móvil se va

¹¹¹ Braithwaite, A., Smith, F.J., *Chromatographic methods*, 4th Ed. Chapman & Hall, New York, 1990.

incrementándose conforme transcurre el análisis, lo cual permite mejorar la eficacia y acortar la duración del análisis. Un gradiente binario se refiere al que utiliza dos disolventes diferentes, ternario si usa tres y cuaternario en el caso de que utilice cuatro. Los gradientes de composición pueden ser lineales, cóncavos o convexos e incluir cambios en la concentración, pH o polaridad.

C. Otro criterio es la relación de polaridad entre la fase móvil y la estacionaria:

- C1.** Cuando la fase móvil es menos polar que la estacionaria se denomina *cromatografía en fase normal (NP)*. La elución se lleva a cabo con disolventes no polares, como etiléter, cloroformo o n-hexano.
- C2.** Cuando la fase móvil es la más polar, se denomina *cromatografía en fase inversa (RP)*. Esta forma es la más utilizada actualmente en cromatografía de líquidos ya que la mayoría de muestras de interés en diversos ámbitos tienen naturaleza hidrofílica. Normalmente usa como fase estacionaria hidrocarburos como C₈ (n-octilo) o C₁₈ (n-octadecilo) y como fase móvil disoluciones acuosas conteniendo metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano. En esta modalidad de fase inversa, el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

D. Por último, la disposición geométrica de las fases también puede emplearse para clasificar las técnicas cromatográficas:

- D1.** Si la fase estacionaria se deposita sobre una superficie abierta (papel, placa de vidrio o metal) se denomina *cromatografía plana* (PC o TLC). Un reservorio contiene la fase móvil que se halla en contacto con la fase estacionaria, de forma que la primera se desplaza por capilaridad.
- D2.** Si se sitúa en un tubo o columna estrecha, se trata de *cromatografía en columna*.

La cromatografía líquida “clásica” o a baja presión se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio rellena con la fase estacionaria. La muestra se introduce por la parte superior y la fase móvil se hace fluir a través de la columna por gravedad. Las separaciones requieren mucho tiempo y además presentan baja eficacia⁴¹. Con el objeto de aumentar la eficacia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase estacionaria se fue disminuyendo, lo cual generó la necesidad de utilizar un sistema de bombeo a alta presión para conseguir un flujo razonable de la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de ***cromatografía líquida de alta resolución*** (HPLC), que, en fase inversa, es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad. La fase estacionaria es un sólido poroso,

generalmente en forma particulada, o bien una fina capa de sustancia líquida ligada a un soporte sólido, contenido en el interior de un tubo habitualmente metálico que da lugar a la columna cromatográfica. La fase móvil es un líquido, ya sea un disolvente o una mezcla de disolventes, a veces con pH modificado mediante adición de ácidos, bases o sistemas tampón.

2.5.2 Conceptos básicos en cromatografía

A continuación se van a introducir una serie de definiciones y conceptos básicos, aplicables a cualquier forma de cromatografía de elución en columna.

La **figura 18** muestra esquemáticamente como dos solutos, A y B, se separan en una columna por cromatografía de elución con una fase móvil líquida. La muestra se introduce por la parte superior de la columna en forma de una banda estrecha. A medida que se desplaza por la columna, los solutos comienzan a separarse y sus bandas individuales se ensanchan, desarrollando un perfil gaussiano. La separación se controla con un detector adecuado situado al final de la columna. La representación gráfica de la señal del detector en función del tiempo recibe el nombre de cromatograma y cada una de las bandas de soluto separadas da lugar a un pico cromatográfico.

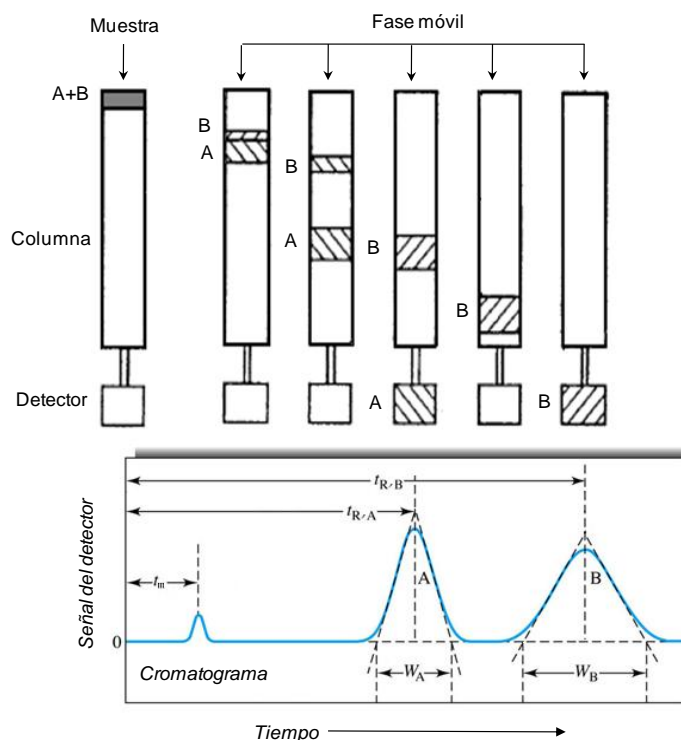


Figura 18. Separación de dos compuestos, A y B, mediante cromatografía de elución en columna; señal de salida del detector en las distintas fases de la elución y parámetros característicos^{105,109}

Los picos cromatográficos (**fig. 18**) se caracterizan por el *tiempo de retención* (t_R), que es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el máximo del pico alcanza el detector, y por la *anchura de la base* del pico (w), que depende de la intersección con la base de las líneas tangentes trazadas a través de los puntos de inflexión a cada lado del pico. El tiempo necesario para que eluyan los componentes no retenidos en la fase estacionaria recibe el nombre de *tiempo muerto* (t_m).

En ocasiones el comportamiento de los picos cromatográficos no es ideal, dando lugar a picos asimétricos: **i) frontal**, prolongación inicial de un pico y que generalmente se debe a la inyección de una cantidad excesiva de muestra, **ii) cola**, prolongación final de un pico, generalmente debida a la presencia de lugares muy activos en la fase estacionaria.

Las separaciones cromatográficas se describen y miden en términos de cuatro conceptos: capacidad, eficacia, selectividad y resolución^{99,112}. La columna debe tener capacidad de retener los solutos, y una apropiada selectividad para resolver los analitos. La eficacia del sistema cromatográfico debe ser optimizada para minimizar el ensanchamiento de banda.

Factor de capacidad (k'). Es la medida de la fortaleza con la que la fase estacionaria retiene a un soluto dado. Puede determinarse en el cromatograma midiendo el tiempo muerto de la columna y el tiempo de retención del soluto, según la ecuación:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

El factor de capacidad es función principalmente del material en que está empaquetada la columna pero puede ser hasta cierto punto manipulado variando la fuerza eluyente del disolvente. Cuanto mayor sea k' , mayor habilidad tendrá la columna para retener solutos, mejorando la resolución pero también incrementando el tiempo de análisis, por lo que habrá que llegar a una solución de compromiso.

Selectividad. Es una medida de la diferencia en el tiempo de retención entre dos picos dados y describe cómo de eficaz es un sistema cromatográfico para separar dos compuestos. La selectividad se define en términos de *factor de selectividad* (α), que es el cociente de los k' de dos solutos ($\alpha=1$ indica que los t_R son idénticos y $\alpha>1$ que $t_{R,B} > t_{R,A}$).

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A}$$

¹¹² Harvey, D., *Química analítica moderna*, Ed. McGraw-Hill, Madrid, 2002.

La selectividad, al igual que la capacidad, depende del material en que está empaquetada la columna, aunque el analista puede influir en ella cambiando la composición de la fase móvil y/o la temperatura.

Eficacia. Al comenzar la separación, el soluto ocupa una banda estrecha, pero, a medida que atraviesa la columna, la anchura de esta banda va aumentando de forma continua. Este proceso, llamado *ensanchamiento de banda*, puede determinar el grado en que dos compuestos sean separados, por lo que debe mantenerse mínimo.

La eficacia de una columna es una medida cuantitativa de la magnitud del ensanchamiento de banda y viene descrito por el *número de platos teóricos* (modo de evaluar la eficacia que consiste en tratar la columna como si estuviera compuesta de pequeñas zonas, o platos, en las que tiene lugar el reparto entre las fases móvil y estacionaria; L, longitud de la columna; H, altura de un plato teórico).

$$N = \frac{L}{H} = 16 \frac{t_R^2}{w^2}$$

La eficacia de una columna mejora con el aumento del número de platos teóricos o con la disminución de la altura del plato teórico.

Resolución (R). Es una medida cuantitativa del grado de separación entre dos picos cromatográficos contiguos (mayor R, mejor separación). Depende de la selectividad, eficacia y capacidad de la columna según la ecuación:

$$R = \frac{k'}{1+k'} \frac{\alpha-1}{\alpha} \frac{\sqrt{N}}{4} = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{0.5(w_B + w_A)}$$

La forma más efectiva de variar la resolución es cambiando α y sobre todo k' . La resolución cambia con la raíz cuadrada N, por lo que su efecto es menos significativo.

2.5.3 Instrumentación en HPLC

La instrumentación básica para llevar a cabo un análisis mediante HPLC está esquematizada en la **figura 19** y consta de: depósitos para la fase móvil, sistema de bombeo para proporcionar un flujo controlado, reproducible y constante, sistema de inyección de la muestra en la corriente de fase móvil, columna cromatográfica (parte fundamental ya que en ella se produce la separación), detector y sistema de adquisición de datos. La columna cromatográfica suele estar en un horno termostaticado para poder

controlar su temperatura e ir precedida de una pre-columna para impedir que lleguen a la columna componentes de la muestra que puedan dañar la fase estacionaria^{98,109}.

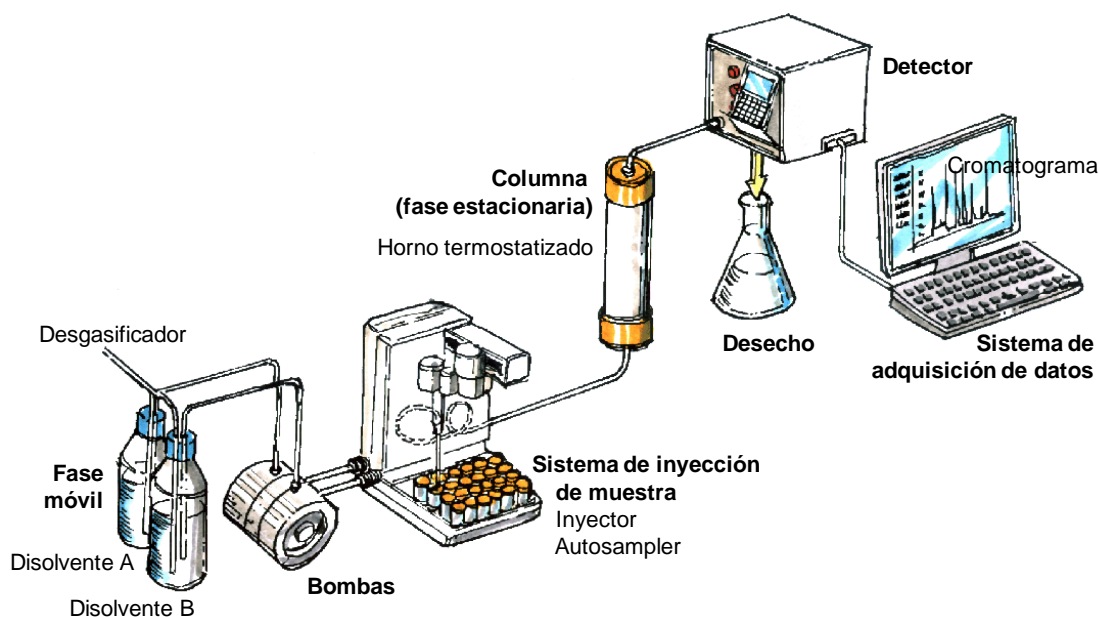


Figura 19. Esquema que incluye los componentes básicos de un sistema de HPLC¹¹³

En una separación mediante HPLC, la inyección de la muestra se realiza normalmente a través de una válvula de seis vías que permite introducir la muestra contenida en un aro o loop de volumen calibrado en el flujo de disolvente. La fase móvil, impulsada por la bomba, transporta la banda de muestra a través de la columna cromatográfica. Una vez en ella, los analitos interactúan con la fase estacionaria de forma que aquellos que sean más afines con la fase móvil serán menos retenidos y eluirán antes, mientras que aquellos que tengan más afinidad por la fase estacionaria avanzarán más lentamente a través de la columna, eluyendo, por tanto, más tarde. La fase móvil puede consistir en uno o varios disolventes. Cuando se trata de una mezcla, la bomba puede programarse para que tome los disolventes de botellas diferentes en una proporción determinada y realice la mezcla en una cámara de mezclado. Para detectar los analitos se colocan uno o varios detectores en serie a la salida de la columna. El procesamiento de la señal proporcionada por el detector (absorbancia, emisión fluorescente, conductividad...) produce el cromatograma, donde cada analito separado estará representado por un pico. La intensidad de cada pico será directamente proporcional a la concentración del analito correspondiente en la muestra.

¹¹³ The Linde Group, http://hiq.linde-gas.com/international/web/lq/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/anal_hplc

Dado que se utilizan altas presiones, es imprescindible evitar la presencia de partículas que puedan obstruir los conductos y la formación de burbujas que puedan deteriorar el relleno de las columnas y que produzcan inestabilidad en la señal del detector. Para evitar las obstrucciones, los disolventes y las muestras a inyectar se filtran con membranas de 0.45 a 0.22 μm . Para evitar la formación de burbujas, los equipos de HPLC cuentan con desgasificadores de disolvente por vacío o por burbujeo con helio y, en el caso de no contar con los mismos, se deben desgasificar los disolventes por medio de un baño de ultrasonidos o agitación bajo vacío antes de utilizarlos como fase móvil.

2.5.4 Desarrollo de un método en HPLC

Los pasos típicos para el desarrollo de un método en HPLC se resumen a continuación^{114,115}:

1. Definir los objetivos del método y de la separación (ej. la estrategia a seguir será diferente si se trata de un método cualitativo, cuantitativo o preparativo).
2. Recoger información sobre la muestra (número de compuestos y rango de concentraciones), los analitos de interés (estructura, peso molecular, solubilidad, pK_a , estabilidad, cromóforos) y la posible existencia de patrones comerciales.
3. Búsqueda bibliográfica sobre la/s metodología/s previamente desarrollada/s para ese tipo de muestras y compuestos, ya que puede/n usarse como punto de partida o como referencia en el método a desarrollar.
4. Desarrollo inicial del método (selección de las fases móvil y estacionaria, detector) y estudio de los primeros cromatogramas.
5. Puesta a punto y optimización final del método.
6. Validación del método.

Cuando se pone a punto un método cromatográfico, se persigue obtener buena resolución y eficacia, que sea específico, sensible, preciso y robusto, con un tiempo de análisis lo más corto posible, trabajando a una presión adecuada y consumiendo el menor disolvente posible (bajo coste por análisis)¹¹⁴.

Cuando los compuestos presentes en la muestra pertenecen a la misma familia las separaciones se realizan en régimen isocrático, pero en la mayoría de los casos los

¹¹⁴ Dong, M.W., *Modern HPLC for practicing scientists*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2006.

¹¹⁵ Snyder, L.R., Glajch, J.L., Kirkland, J.J., *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons, USA, 1997.

extractos vegetales contienen gran diversidad de compuestos fenólicos por lo que es más común la elución en gradiente (60-80% de los métodos desarrollados en el análisis de moléculas orgánicas pequeñas son en fase inversa). La selección de la fase estacionaria (columna) y de la fase móvil tiene gran importancia, ya que los componentes de la muestra interactúan con ambas. Normalmente se elige en primer lugar una fase estacionaria adecuada y, seguidamente, se selecciona la fase móvil, después de realizar una serie de ensayos. Ésta debe tener una composición tal que sea compatible con la fase fija, que disuelva los componentes a analizar y que permita una buena separación. Luego se optimizan las condiciones de flujo de disolvente, cantidad de muestra a inyectar y, en el caso de un detector de absorción se determinará/n la/s longitud/es de onda de detección que resulten más idóneas.

Fase estacionaria. Es el corazón de las separaciones y afecta a la selectividad, capacidad y eficacia del método (*fig. 20*)⁹⁹.

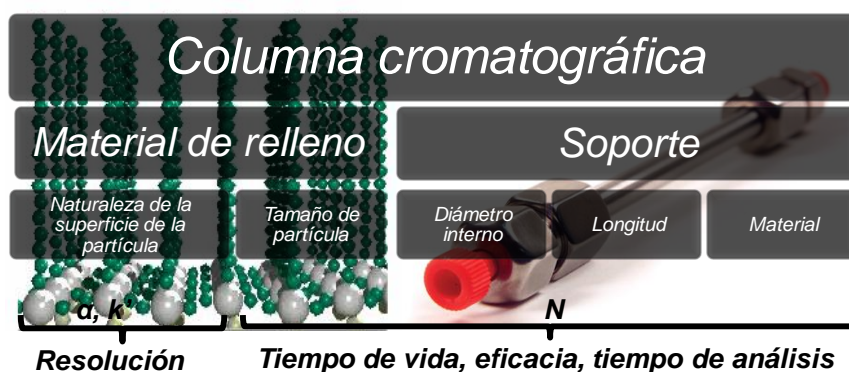


Figura 20. Influencia de la fase estacionaria en las separaciones cromatográficas

Las columnas de HPLC constan de dos partes, el relleno químico de la columna y su soporte o hardware. El soporte debe ser construido con materiales que aguanten altas presiones y químicamente resistente a la fase móvil (el material más ampliamente usado es acero inoxidable). Con respecto al relleno, a pesar de la gran oferta existente, en fase inversa se utilizan fundamentalmente dos tipos, C-18 y C-8, formadas por grupos no polares unidos a sílice. Además de elegir el tipo de relleno en sí, hay que seleccionar el tamaño de partícula y la longitud y diámetro interno de la columna.

➤ **Tamaño de partícula.** El tamaño de partícula está directamente relacionado con la eficacia de la separación, ya que determina el número de platos teóricos. Las columnas con partículas de 3-5 μm son las más utilizadas en los equipos de HPLC convencionales. Partículas más pequeñas ofrecen mayor superficie y mejor separación, consiguiendo mejor eficacia y resolución. Sin embargo, fases

estacionarias de menos de 3 μm de diámetro de partícula producen un gran aumento de presión (no tolerado por los equipos de HPLC convencionales). Los equipos más modernos de HPLC incorporan mejoras para poder trabajar a presiones más altas; cabe destacar los equipos de UPLC (*Ultra-high-Pressure Liquid Chromatography*) y RRLC (*Rapid Resolution Liquid Chromatography*)¹¹⁶, que pueden trabajar con presiones de hasta 600 y 1000 bares, respectivamente. Esto ha permitido mejorar la eficacia y reducir los tiempos de análisis, al utilizar tamaños de partícula más pequeños y flujos más elevados.

➤ *Diámetro interno.* Es un aspecto crítico que determina la cantidad de muestra que se puede cargar en la columna y también influye en el flujo y la sensibilidad. Cuanto mayor es el diámetro interno, mayor es la capacidad de carga y el flujo que se puede usar, pero también es mayor la dilución de pico disminuyendo la sensibilidad. Las más utilizadas son las de diámetro interno entre 2-5 mm denominadas columnas de rango analítico. Para las aplicaciones con MS se recomienda el uso de columnas con diámetros internos y tamaños de partícula más pequeños, para lo cual es necesario adaptar los equipos de HPLC⁴⁵. Las columnas de diámetro interno más grande se utilizan normalmente para el aislamiento y purificación de compuestos y se denominan columnas (semi)preparativas.

➤ *Longitud.* Afecta tanto a la eficacia como a la velocidad de la separación. El tiempo de análisis aumenta con la longitud de la columna, pero también la eficacia. El rango va desde los 20 a los 300 mm de longitud.

Fase móvil. Idealmente, los disolventes usados como fase móvil deben solubilizar a los compuestos de la muestra, deben ser no corrosivos para el equipo de HPLC, de alta pureza, bajo coste, baja viscosidad y toxicidad y compatibles con el detector¹¹⁴.

En la elección de la fase móvil deben tenerse en cuenta la naturaleza de los analitos que se quieren separar y la fase estacionaria seleccionada.

Con frecuencia, un solo disolvente no resulta adecuado para una determinada separación, recurriéndose en estos casos a mezclas binarias o ternarias, con objeto de encontrar la combinación más adecuada en lo que a naturaleza (selectividad) y fuerza eluyente (retención) de la fase móvil se refiere. Los disolventes que se van a combinar deben ser miscibles a cualquier concentración. Existe bastante consistencia en la elección de disolventes, aunque gran variabilidad en los porcentajes y gradientes. Un sistema binario

¹¹⁶ Las siglas UPLC son una marca registrada de Waters Corporation y RRLC de Agilent Technologies

de disolventes es el más empleado, con agua acidificada (disolvente A) y un modificador orgánico puro o también acidificado (disolvente B), o incluso A y/o B puede consistir en mezclas de ambos. Normalmente la fase orgánica es acetonitrilo o metanol, aunque también se han usado propanol, butanol, acetato de etilo o tetrahidrofurano⁴⁵. Seleccionada la fase móvil, puede emplearse una elución isocrática o en gradiente. Un buen lugar para empezar a elegir tipos de gradientes son los catálogos comerciales, los manuales o en bibliografía.

Otra modificación de la fase móvil que puede afectar a la retención del compuesto es, por ejemplo, la adición de sales inorgánicas que provoca un aumento lineal en la tensión superficial; como la entropía de la interfase compuesto-disolvente está controlada precisamente por la tensión superficial, se produce un aumento del tiempo de retención.

Otros parámetros a optimizar relacionados con la fase móvil son el pH, el flujo y la temperatura¹¹⁷:

➤ *pH*. El pH de la fase móvil va a afectar drásticamente la retención de aquellas especies ionizables que pueden presentarse en forma protonada y desprotonada en el intervalo de pH de trabajo, puesto que ambas formas manifestarán diferente retención. A efectos prácticos, si quiere utilizarse el pH de la fase móvil como un parámetro capaz de alterar sustancialmente la separación, habrá que ajustarlo de modo que su valor esté comprendido entre el $pK_a \pm 1$ de la especie/s de interés. En la separación de compuestos fenólicos, acidificar la fase móvil tiene dos objetivos: disminuir las colas en los picos cromatográficos y evitar la ionización de los analitos durante el análisis ($pH < 4$) para mejorar la resolución y reproducibilidad. El ácido acético es el más usado como modificador, aunque también se han descrito otros como el fórmico, sulfúrico, perclórico, fosfórico o trifluoroacético. En ocasiones, en lugar de la adición de ácidos se recomienda el uso de tampones (5-50 mM) en la fase acuosa⁴⁶. En aplicaciones con MS es necesario utilizar tampones volátiles.

➤ *Flujo y temperatura*. Aumentando el flujo de fase móvil se reducen los tiempos de análisis pero se produce un aumento de presión. Para disminuir la presión se aumenta la temperatura, ya que a temperaturas elevadas la viscosidad del disolvente disminuye, dando lugar a que el eluyente fluya más rápidamente. Habrá que modificar simultáneamente ambos parámetros para conseguir separaciones adecuadas, llegando a un compromiso entre tiempos cortos y buena resolución de los picos. Se deben optimizar cumpliendo con los valores de presión indicados para la

¹¹⁷ Rubinson, K.A., Rubinson, J.F., *Análisis instrumental*, Pearson Education S.A., Madrid, 2000.

columna, para tener el máximo tiempo de vida de la misma. No es estrictamente necesario un control detallado de la temperatura de la columna, pero las separaciones son más reproducibles si la temperatura se mantiene constante. En el análisis de polifenoles, los flujos suelen variar de 0.15 a 1.80 ml min⁻¹, siendo el más común 1 ml min⁻¹, con tiempos de análisis entre 30 y 150 min, y la temperatura de la columna entre 20 y 45°C.

En fase inversa, el orden de elución sigue el siguiente patrón: ácidos benzoicos < ácidos cinámicos < flavonoides, aunque la superposición entre miembros de las distintas familias es inevitable debido al gran número de compuestos que existen. Si el compuesto contiene sustituyentes apolares (ej. grupos metoxi), el tiempo de retención será mayor, mientras que si contiene azúcares (glucósido) u otros compuestos polares como el ácido quínico, aumenta la polaridad y eluyen antes que el correspondiente compuesto libre⁴⁸.

2.6 Sistemas de detección

Una vez concluida la separación, surge el problema de detectar las bandas de soluto y, en caso necesario, medir su concentración. Para ello se utilizan dispositivos capaces de transformar en corriente eléctrica alguna propiedad de la fase móvil o del tampón de separación que varía cuando hay alguna otra sustancia disuelta, aunque sea en proporción muy pequeña⁹⁸. Las características de un detector ideal son:

- ✓ Buena sensibilidad para los compuestos de interés.
- ✓ La señal debe ser nula en ausencia de analito, o lo que es lo mismo, la línea base (señal que se obtiene cuando sólo llega al detector fase móvil, estando el detector operativo y conectado todo el sistema) debe tener un valor muy bajo. Asimismo, la deriva (variación de la pendiente media de la línea base a lo largo del tiempo) y el ruido de fondo (alteración de la línea base producida durante un cromatograma por causas ajenas a los compuestos inyectados) deben ser mínimos.
- ✓ Señales fiables, es decir, estables y reproducibles en el tiempo (a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales).
- ✓ Bajos límites de detección (combinación de una alta sensibilidad con una baja fluctuación en la señal de fondo).
- ✓ Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud, es decir, que el intervalo de concentración o cantidad de soluto dentro del cual el detector responde con cambios en su señal sea lo más amplio posible.

- ✓ Tiempo de respuesta corto (respuesta del detector rápida ante un cambio en la concentración de analito).
- ✓ La presencia del detector no debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- ✓ Respuesta semejante para todos los analitos, o respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de ellos para evitar así posibles interferencias por parte de otras sustancias presentes en la muestra.

Todas estas condiciones influyen a la hora de decidir el sistema de detección que se acopla tanto a HPLC como a CE. En el caso de la CE, además, el detector debe ser sensible a cantidades de muestra pequeña y compatible con las dimensiones físicas del capilar, aún en detrimento de otras cualidades.

A continuación se enumeran distintos sistemas de detección que pueden usarse en la determinación de compuestos fenólicos:

Técnicas ópticas

Absorción UV-Visible

Fluorescencia

Fosforescencia

Quimioluminiscencia

Infrarrojo

Resonancia magnética nuclear

Dispersión Raman

Termoóptico

Índice de refracción

Técnicas electroquímicas

Conductimetría

Potenciometría

Amperometría

Otras técnicas

Espectrometría de masas

Radiométricos

En el trabajo experimental se han empleado la detección espectrofotométrica UV-Vis acoplada a HPLC y la MS acoplada tanto a HPLC como a CE. En los siguientes apartados se procederá a la descripción de ambos sistemas de detección.

2.7 Absorción UV-Visible

Los métodos basados en la absorbancia de luz UV-Vis son los más utilizados en equipos comerciales de HPLC y CE^{101,115}, al permitir la determinación de un gran número de compuestos y grupos funcionales, a su facilidad de manejo y relativo bajo coste. Además presenta buena sensibilidad, gran rango dinámico lineal, buena estabilidad a los cambios de flujo y temperatura y no es destructivo.

Este detector tiene su fundamento en la interacción entre la radiación UV-Vis y la materia, dando origen al fenómeno conocido como absorción de la radiación. Son muchas las moléculas que pueden absorber radiación UV-Vis, lo que hace que pueda considerarse prácticamente como un detector universal. Ser sensible a la gran mayoría de las especies químicas puede ser una ventaja, ya que puede utilizarse para resolver muchos problemas analíticos, pero también un inconveniente, si se requiere selectividad. Además, como los espectros moleculares de absorción son de bandas anchas, cualquier compuesto que coeluya con el analito probablemente interferirá en la cuantificación ya que es difícil seleccionar una longitud de onda de medida del analito a la que el interferente no absorba. Consecuentemente, la utilización del detector UV-Vis obliga a establecer métodos con elevada resolución de los analitos de interés.

Los detectores de absorción UV-Vis pueden ser de tres tipos:

- *Longitud de onda fija*: son los más simples y consta de una lámpara de mercurio a baja presión, que emite una radiación monocromática a 254 nm.
- *Longitud de onda variable*: son más versátiles. Tienen lámparas de deuterio, xenón, o wolframio que trabajan en el rango del UV-Vis, 190-650 nm, y un monocromador, con el que se puede elegir la longitud de onda deseada.
- *Diodo array (DAD)*: es el más moderno y más potente de los tres, conduce la luz mediante un sistema de diodos alineados, evita la dispersión y registra el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector.

Cuando este detector se utiliza acoplado a CE, una pequeña sección de la capa de poliiimida que envuelve al capilar para darle resistencia, tiene que eliminarse mediante calentamiento con una pequeña llama, y la detección se lleva a cabo a través de esta ventana. Debido a la utilización de capilares con diámetros internos muy pequeños, la sensibilidad del detector UV-Vis en el acoplamiento con CE es mucho menor que cuando se acopla a HPLC^{101,103}. Además, tanto la disolución portadora en CE como los disolventes utilizados en HPLC tienen que ser cuidadosamente seleccionados de manera que no absorban a la longitud de onda de trabajo.

Todos los compuestos fenólicos, debido a la existencia de dobles enlaces conjugados, exhiben absorbancia en la región del UV-Vis. Las longitudes de onda más ampliamente usadas han sido 254 y 280 nm. En general, ambas longitudes de onda exhiben una sensibilidad analítica parecida, pero 280 se usa más frecuentemente debido a la absorción base de la fase móvil, sobre todo cuando se usa ácido acético como modificador ácido⁴². Si bien una identificación inequívoca es difícil de conseguir utilizando la

absorción UV-Vis como sistema de detección, a veces incluso disponiendo de patrones (comerciales, sintetizados o aislados), sí que puede resultar muy útil en la determinación de la familia a la que los compuestos fenólicos pertenecen, ya que cada familia posee bandas de absorción características.

Los compuestos fenólicos presentan principalmente dos bandas de absorción, una entre 300-380 nm (banda I) y otra entre 240-280 nm (banda II). La banda I se asocia con sistemas cinamoil mientras que la banda II con sistemas benzoil, de manera que los ácidos hidroxicinámicos se monitorizan a 320 nm y los ácidos hidroxibenzoicos a 280 nm. Con respecto a los flavonoides, cada subclase presenta absorciones características, por ejemplo las flavonas y flavonoles presentan bandas intensas a 320-370 nm, las flavanonas a 280, las chalconas absorben en ambas bandas, y las antocianinas presentan una banda muy característica a 520 nm (*fig. 21*)¹¹⁸.

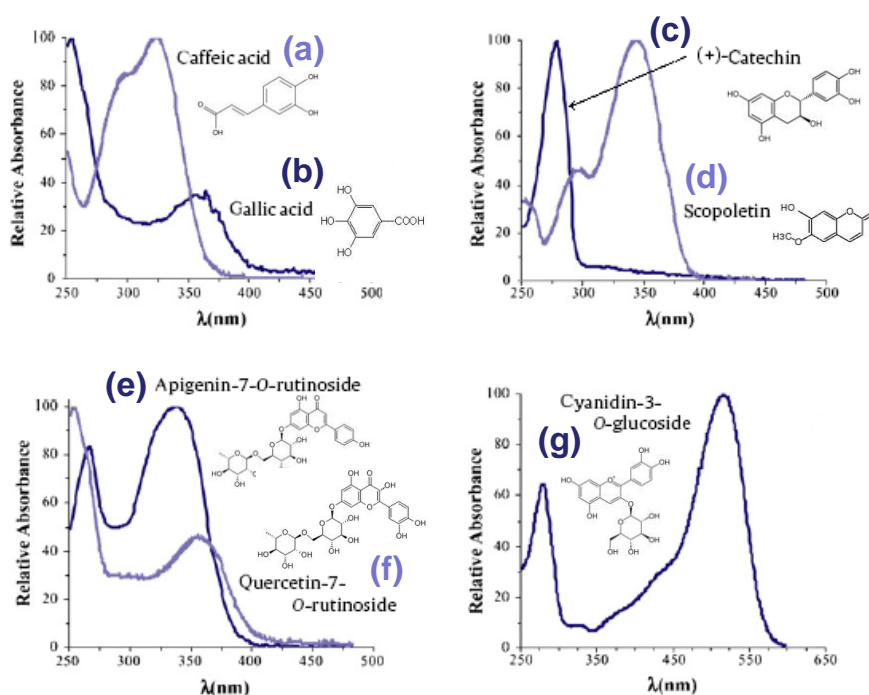


Figura 21. Espectros UV-Vis característicos de algunas familias de compuestos fenólicos: **(a)** ácido hidroxicinámico, **(b)** ácido hidroxibenzoico, **(c)** flavanol, **(d)** cumarina, **(e)** flavona, **(f)** flavonol, **(g)** antocianina

¹¹⁸ Abad-García, B., Berrueta, L.A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F., *A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 2009, 1216, 5398-5415.

2.8 Espectrometría de masas (MS)

2.8.1 Principios e instrumentación

En la actualidad, la MS es probablemente, de entre todas las herramientas analíticas, la de mayores aplicaciones. El primer espectrómetro de masas se construyó en 1912 y desde entonces su desarrollo no ha parado, pasando de analizar sólo pequeñas moléculas inorgánicas a ser capaz de analizar prácticamente cualquier molécula¹¹⁹. Este auge de la técnica se debe principalmente a su selectividad y al hecho de que es uno de los pocos sistemas de detección que proporciona información estructural.

La MS se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Puede utilizarse directamente (experimentos de inyección directa)¹²⁰, aunque su combinación con una técnica de separación presenta la ventaja de proporcionar una segunda dimensión de separación, ya que tras separar los compuestos según su tiempo de retención, el espectrómetro de masas produce una separación en función de la relación m/z , siendo muy útil en el análisis de muestras complejas¹²¹.

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, pero todos incluyen los elementos que se muestran en la **figura 22**: sistema de introducción de muestra, fuente de ionización (interfase), acelerador de iones mediante un campo eléctrico, analizador de masas (sistema de separación de los iones de acuerdo a su relación m/z) y detector, junto con un procesador adecuado de la señal.

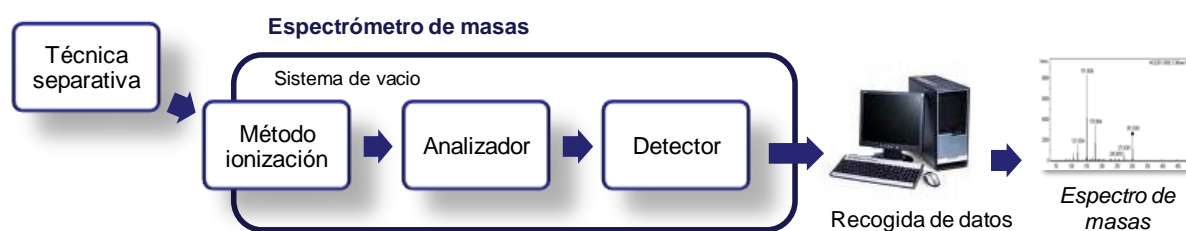


Figura 22. Esquema de un acoplamiento entre una técnica separativa y MS

¹¹⁹ El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub J., *Mass spectrometry, review of the basics; electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers*, Appl. Spectrosc. Rev. 2009, 44, 210-230.

¹²⁰ Lerma-García, M.J., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., *Classification of vegetables oils according to their botanical origin using profiles established by direct infusion mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008, 22 973-978.

¹²¹ Tomer K.B., *Separation combined with mass spectrometry*, Chem. Rev. 2001, 101, 297-328.

La versatilidad de MS se debe, en parte, al amplio abanico de posibilidades de cada una de las secciones del espectrómetro, en concreto el resultado que se obtenga va a depender notablemente de cuáles sean la interfase y el analizador utilizados.

La interfase es la “puerta” al resto del instrumento y el compartimento donde se producen las especies cargadas¹¹⁹. La característica general a todas las técnicas de ionización que se utilizan es la transferencia de una cierta energía al analito. Se pueden clasificar atendiendo al grado de fragmentación que provoquen en la estructura de la molécula: técnicas de ionización fuertes, como el impacto electrónico (EI), y otras más suaves (las cuales transmiten una energía interna mínima al analito durante el proceso de ionización), entre las que se pueden encontrar electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), ionización química (CI), bombardeo atómico (FAB), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), etc¹²².

Para llevar a cabo el acoplamiento de las técnicas separativas empleadas que trabajan en fase líquida (HPLC y CE), con un espectrómetro de masas, en el que las sustancias para ser analizadas deben estar en fase gaseosa, es necesaria la utilización de una interfase adecuada que transfiera los iones desde una fase a otra. A pesar de la variedad de interfases que se han desarrollado para estos acoplamientos^{123,124}, la más utilizada es la interfase ESI. Esta interfase permite un análisis eficaz de compuestos polares, lábiles, y/o de compuestos con un alto peso molecular (normalmente hasta 100.000 Da). Por otro lado, es fácil de implementar, es sensible y puede usarse en un amplio intervalo de aplicaciones.

El analizador de masas es dónde se produce la discriminación entre los iones de diferente m/z al ser sometidos a campos eléctricos y/o magnéticos constantes, por pulsos o que varían periódicamente en el tiempo¹²⁵. Los más comúnmente usados son: cuadrupolos (Q), trampas de iones (IT), triples cuadrupolos (QqQ), tiempos de vuelo (TOF), transformada de fourier-resonancia de ión ciclotrónica (FT-ICR), orbitrap (OT) y algunos de los acoplamientos entre varios de los mencionados¹²⁶. Todos ellos se diferencian en el tamaño y precio, resolución, rango de masas y exactitud de masa que ofrecen y en la capacidad de

¹²² Vestal, M.L., *Methods of ion generation*, Chem Rev. 2001, 101, 361-375.

¹²³ Gelpi, E., *Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments*, J. Mass Spectrom. 2002, 37, 241-253.

¹²⁴ Edwards, E., Thomas-Oates, J., *Hyphenating liquid phase separation techniques with mass spectrometry: on-line or off-line*, Analyst 2008, 130, 13-17.

¹²⁵ Marshall, A.G, Hendrickson, C.L., *High-resolution mass spectrometers*, Annu. Rev. Anal. Chem. 2008, 1, 579-599.

¹²⁶ McLuckey, S.A., Wells, J.M., *Mass analysis at the advent of the 21st century*, Chem. Rev. 2001, 101, 571-606.

determinar distribuciones isotópicas y de realizar experimentos de masas en tándem (MS/MS o MSn)¹¹⁹.

En la siguiente tabla se muestran las interfases y analizadores más utilizados en el acoplamiento de HPLC y CE con MS. En azul claro se han marcado los empleados en el desarrollo experimental de esta memoria, que se comentarán con más detalle.

Tabla 5. Interfases y analizadores de masas utilizados en el acoplamiento HPLC/CE-MS

Fuente de ionización	Analizador de masas
<ul style="list-style-type: none"> • CF-FAB: flujo continuo y bombardeo por átomos rápidos • ICP: plasma acoplado inductivamente • MALDI: ionización y desorción por láser asistida por matriz • APCI: ionización química a presión atmosférica • ESI: ionización por electrospray • ISP: electrospray asistido neumáticamente 	<ul style="list-style-type: none"> • Q: cuadrupolo • IT: trampa de iones • EBE: sector magnético • TOF: tiempo de vuelo • OT: orbitrap • FT-ICR: transformada de Fourier-resonancia ciclotrónica • HT-TOF: transformada de Hadamard-tiempo de vuelo • Q-TOF: cuadrupolo-tiempo de vuelo • IT-TOF: trampa de iones-tiempo de vuelo • QQ: doble cuadrupolo • QqQ: triple cuadrupolo

A continuación se recogen varios conceptos útiles en lo que a la adquisición de datos en MS se refiere:

- En un **espectro de masas** (espectro MS), el eje de abscisas es la relación m/z , es decir, la masa del ion (en unidades de masa atómica) dividida por el número de cargas que lleva. La mayoría de los iones tienen una sola carga, de modo que m/z suele equivaler a la masa del ión en unidades de masa atómica.
- El **rango de masas** es el intervalo de masas seleccionado.
- El **poder de resolución** es el grado de separación que puede alcanzar un analizador de masas (ej. si pueden separarse iones de masa 100.0 y 100.1, el poder de resolución será $100/0.1=1000$). Existen distintos criterios para definir la separación entre iones. El más extendido es el uso de la anchura total de un pico a la mitad del máximo de su altura (FWHM). La separación de los picos obtenidos en un espectro de masas por un instrumento con un poder de resolución específico se mide en términos de resolución, expresado como ppm¹²⁷.
- **Cromatograma del ion total** (TIC, *total ion current* o *total ion chromatogram*): modo de registro de la señal en el que se muestra la corriente iónica total en cada instante.

¹²⁷ Baldwin, M.A., *Mass spectrometers for the analysis of biomolecules*, Meth. Enzymol. 2005, 402, 3-48.

- **Cromatograma o electroferograma del pico base** (BPC o BPE, *base peak chromatogram or electropherogram*): modo de registro de la señal que señala aquellos picos que contienen una única especie molecular predominante, restándole importancia a los picos muy heterogéneos y al ruido. TIC es la suma del ruido y la suma de la señal de cada barrido, mientras que BPC sólo muestra la contribución de los componentes más intensos con mayor resolución y mejor relación señal/ruido.
- **Cromatograma o electroferograma del ion extraído** (EIC o EIE, *extracted ion chromatogram or electropherogram*): muy similar al BPC pero para una masa en particular seleccionada por el usuario.

2.8.2 Ionización por electrospray (ESI)

Esta técnica de ionización suave ha revolucionado el campo de los acoplamientos entre técnicas de separación que trabajan en fase líquida y MS para el análisis de biomoléculas polares, no volátiles y térmicamente lábiles, en parte por su capacidad de formar iones mono- o multicargados; un incremento en el número de cargas de una molécula disminuye el valor de su relación m/z , lo cual permite detectar compuestos de pesos moleculares muy altos empleando analizadores que trabajan con rangos de masas limitados¹⁰¹.

En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo (**fig. 23**). El primer paso en la creación de iones aislados es la formación de un cono de líquido (“cono de Taylor”) en la punta de la aguja de la interfase, desde donde se expelen microgotas cargadas; es entonces cuando la muestra, procedente del capilar o columna de separación y generalmente con la ayuda de un gas nebulizador, se carga y dispersa simultáneamente. El disolvente se va evaporando de las microgotas, aumentando su densidad de carga eléctrica, de modo que los iones de la misma polaridad son atraídos hacia la superficie de la misma debido al campo electrostático que se aplica entre la salida de la interfase y la entrada al espectrómetro de masas ($\pm 2-5$ kV). Cuando las fuerzas de repulsión electrostáticas de los iones son mayores que la tensión superficial que mantiene unidas las gotas en forma esférica (“límite de Rayleigh”), las microgotas se van dividiendo en otras aún más pequeñas (“explosiones de Coulomb”), que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos hasta que finalmente se forman iones cargados

desnudos que pasan a fase gaseosa, siendo atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado¹²⁷⁻¹²⁹.

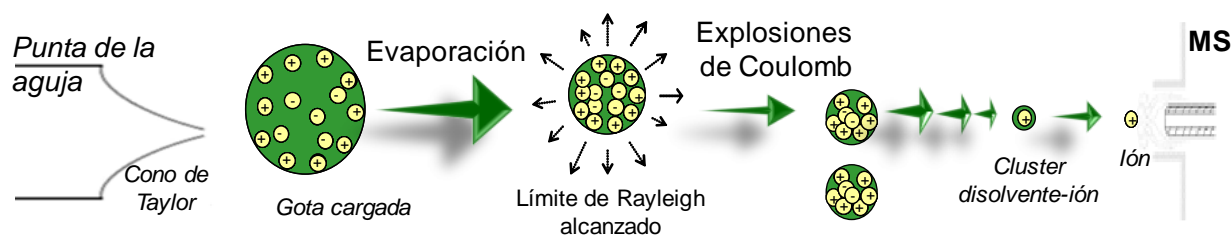


Figura 23. Esquema del proceso de formación del electrospray

La ionización puede llevarse a cabo en el modo positivo o negativo. En el modo positivo, se producirá la formación de iones protonados $[M+H]^+$ o múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$, donde n es el número de protones cargados positivamente en la molécula, así como de aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En el modo negativo, se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados¹⁰¹.

El acoplamiento de técnicas separativas que trabajan en fase líquida con el espectrómetro de masas a través de la interfase ESI presenta diferentes dificultades en función de la técnica separativa empleada, que se solventan utilizando distintos diseños de este tipo de interfase.

2.8.2.1 Acoplamiento CE-ESI-MS

En el acoplamiento CE-ESI-MS, el primer problema que se plantea es la incompatibilidad del flujo procedente del capilar de separación (de hasta 100 nl min^{-1}), con el flujo necesario para la formación de un electrospray estable ($1\text{-}200 \text{ } \mu\text{l min}^{-1}$). El segundo problema es cerrar y mantener el circuito eléctrico que se forma entre los extremos del capilar al aplicar la diferencia de potencial y que se requiere para llevar a cabo la separación en CE. Otro inconveniente que aparece es la incompatibilidad del espectrómetro de masas con algunos de los electrolitos usados en los diferentes modos de CE ya que con su escasa volatilidad contribuyen a incrementar el ruido de fondo en la detección por MS, arruinando la sensibilidad, y llegando a obstruir y/o contaminar el sistema de detección en algunos casos¹⁰¹.

¹²⁸ Cole, R.B., *Electrospray ionization mass spectrometry*, John Wiley & Sons, New York, 1997.

¹²⁹ Busch, K.L., *Understanding Mass Spectra. A basic approach*, John Wiley & Sons, New York, 1999.

Todas estas dificultades han forzado el desarrollo de diversas estrategias de tipo instrumental para CE-ESI-MS^{121-124,128,130-133}, teniendo como objetivo la formación de un electrospray estable y el mantenimiento de la corriente eléctrica en el interior del capilar. Con esta idea, se han desarrollado fundamentalmente tres tipos de interfase ESI: sin flujo adicional, con flujo adicional y con unión líquida, siendo la interfase ESI con flujo adicional la única disponible comercialmente hasta la fecha y la empleada en el acoplamiento CE-MS en esta memoria.

Interfase ESI con flujo adicional. Como se puede ver en la siguiente figura, esta interfase está formada por tres tubos concéntricos^{100,101}.

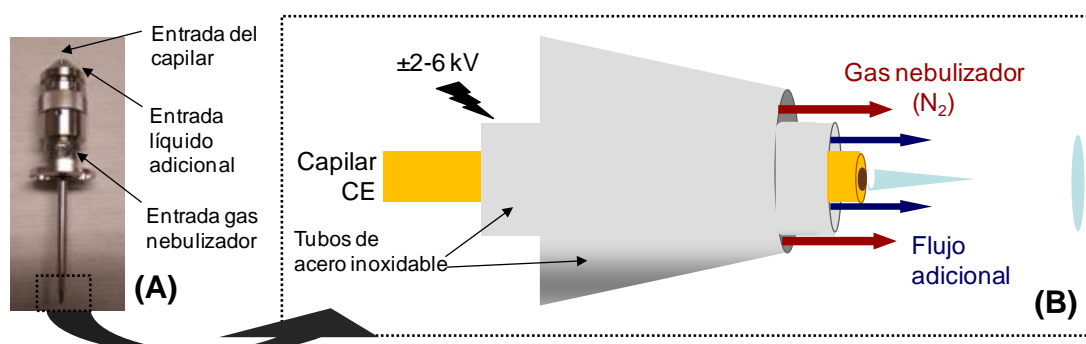


Figura 24. Fotografía (A) y esquema de la punta (B) de una interfase ESI con flujo adicional

El primero de los tubos es el propio capilar de separación que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que se hace fluir el líquido adicional, y por un tercer tubo por el cual se introduce un gas nebulizador que favorece la formación del electrospray.

Para que una interfase ESI trabaje de modo estable, como ya se ha comentado, requiere flujos del orden de $\mu\text{l min}^{-1}$, de modo que el flujo de nI min^{-1} (con el que típicamente se trabaja en CE) se aumenta mediante el empleo del líquido adicional, dando lugar así a la formación de un electrospray estable. Además, el flujo adicional facilita el cierre del circuito eléctrico con el interior del capilar, pues permite el contacto entre el electrolito de separación que fluye del interior del capilar y el tubo metálico que rodea el capilar de separación (**fig. 24**)¹⁰¹.

¹³⁰ Cai, J., Henion, J., *Capillary electrophoresis-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1995, 703, 667-692.

¹³¹ Ding, J.M., Vouros, P., *Advances in CE/MS. Recent developments in interfaces and applications*, Anal. Chem. News Featur. 1999, 71, 378A-385A.

¹³² Chao, B.F., Chen, C.J., Li F.A., Her, G.R., *Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry using a pulsed electrospray ionization source*, Electrophoresis, 2006, 27, 2083-2090.

¹³³ Zamfir, A.D., Dinca, N., Sisu, E., Peter-Katalinic, L., *Copper-coated microsyringe interface for on-line sheathless capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry of carbohydrates*, J. Sep. Sci. 2006, 29, 414-422.

Es una interfase robusta y de fácil manejo, aunque con algunas limitaciones, como es la disminución de la sensibilidad debido a la dilución que el líquido adicional produce sobre las bandas de los analitos que salen del capilar. Por otro lado, es necesario considerar otros parámetros como son la composición y el flujo de la disolución adicional, presión del gas nebulizador, situación del capilar con respecto al tubo concéntrico que lo rodea, naturaleza del electrolito de separación, etc., ya que van a influir tanto sobre la intensidad de la señal MS como sobre la resolución de la separación^{134,135}.

En líneas generales, pueden darse las siguientes recomendaciones experimentales para llevar a cabo con éxito el acoplamiento CE-MS con interfase ESI de flujo adicional¹⁰¹:

1) El capilar debe sobresalir con respecto al tubo concéntrico que lo rodea un tercio aproximadamente de su diámetro externo.

2) El flujo adicional debe ser suficientemente conductor como para cerrar el circuito eléctrico con el interior del capilar de separación, pero con una fuerza iónica no demasiado alta para evitar descargas en la fuente de ionización.

3) Normalmente el flujo adicional debe contener un porcentaje alto de disolvente orgánico, y una pequeña cantidad de ácido o base para mejorar la ionización de las sustancias en estudio según se trabaje en modo positivo o negativo.

4) Los flujos de líquido adicional y de gas nebulizador deben mantenerse en valores suficientemente bajos como para permitir un electrospray estable, evitando la generación del efecto de succión o excesiva dilución de los analitos.

2.8.2.2 Acoplamiento HPLC-ESI-MS

En este acoplamiento (**fig. 25**), al contrario de lo que ocurre en CE, el principal obstáculo es la enorme cantidad de disolvente que acompaña al analito, con flujos de hasta 2-3 ml min⁻¹ en algunos casos. Los espectrómetros de masas son aparatos de alto vacío que no pueden recibir fácilmente caudales de disolvente tan elevados, especialmente aquellos que operan con masas exactas, como los analizadores TOF, que se ven muy afectados por la humedad que entra al sistema dando lugar a grandes desviaciones en la exactitud de masa. Normalmente las interfases ESI empleadas para HPLC aceptan flujos comprendidos entre 0.001-1 ml min⁻¹, aunque el flujo recomendado a la entrada del

¹³⁴ Samskog, J., Wetterhall, M., Jacobsson, S., Markides, K.. *Optimization of capillary electrophoresis conditions for coupling to a mass spectrometer via a sheathless interface*, J. Mass Spectrom. 2000, 35, 919-924.

¹³⁵ Huikko, K., Kotiaho, T., Kostiainen, R., *Effects of nebulizing and drying gas flow on capillary electrophoresis/mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2002, 16, 1562-1568.

espectrómetro de masas está entre $0.2\text{-}0.5\text{ ml min}^{-1}$, dependiendo del analizador usado. Cuando se utilicen flujos elevados, es recomendable el uso de divisores de flujo entre la salida de la columna cromatográfica y la entrada de la interfase, aunque esto suponga una disminución de la sensibilidad al eliminarse parte de la muestra. Otra posible solución es utilizar columnas más estrechas, de 2.1 mm de diámetro, con caudales de 0.2 ml min^{-1} , que si se pueden introducir directamente en el espectrómetro de masas. Además, cuando se usa MS se deben evitar los aditivos no volátiles en la fase móvil (como el tampón fosfato). En fase inversa, se deben utilizar combinaciones agua y metanol o acetonitrilo con modificadores orgánicos volátiles.

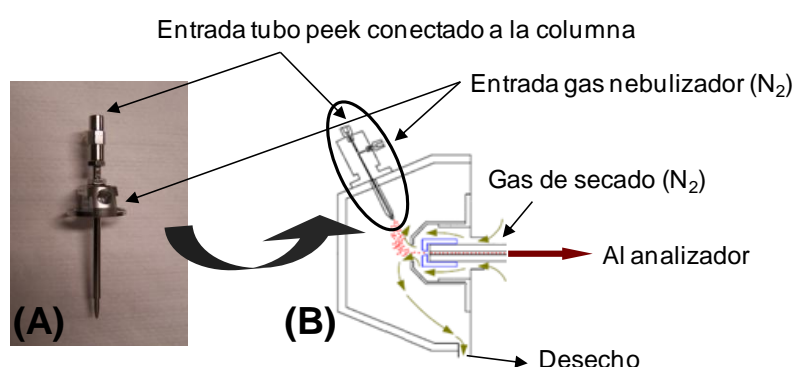


Figura 25. Fotografía de la interfase ESI (A) y esquema de la entrada del espectrómetro de masas (B) en el acoplamiento HPLC-ESI-MS

Se pueden dar las siguientes recomendaciones experimentales para llevar a cabo con éxito el acoplamiento HPLC-ESI-MS:

- 1) Utilizar tubos de conexión adecuados entre el cromatógrafo, el divisor y la interfase para minimizar el ensanchamiento de la banda fuera de la columna.
- 2) Se recomienda lavar con isopropanol-agua la interfase, los tubos de conexión y la válvula después de una serie de análisis. Una aguja limpia y no dañada es esencial para alcanzar buenas condiciones de electrospray.
- 3) Siempre que sea posible adicionar una pequeña cantidad de ácido o base a la fase móvil para mejorar la ionización.
- 4) Seleccionar condiciones adecuadas del gas nebulizador (presión, flujo y temperatura) para obtener un spray estable. Estas condiciones dependen del flujo de fase móvil que llegue a la interfase, cuanto mayor sea el flujo, mayor serán los valores de estos parámetros.

2.8.3 Analizadores de masas

Una vez que en la interfase se ha llevado a cabo la transferencia de los iones desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones son dirigidos hacia el analizador de masas. Los analizadores de masas permiten la separación, fragmentación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, proporcionando información sobre su masa molecular.

Como ya se ha indicado, existen diferentes tipos de analizadores, pero los utilizados en el trabajo experimental de esta memoria han sido tres: IT, TOF y Qq-TOF.

2.8.3.1 Trampa de iones (IT)

El analizador IT consiste fundamentalmente en un electrodo anular y dos electrodos laterales de geometría hiperbólica, que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones. Cuando los iones están dentro, se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa. Este campo atrapa y concentra los iones dada su trayectoria de oscilación estable. La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación m/z de los iones. Para llevar a cabo la determinación de las especies que entran o se forman en la trampa, los potenciales de los electrodos se alteran sometiendo a los iones confinados a una rampa lineal de radiofrecuencia (RF), de manera que son expulsados progresivamente en la dirección axial en función de su relación m/z , como resultado de desestabilizaciones de las trayectorias que mantienen dentro de la trampa. Una vez que estos iones llegan al detector, la señal se procesa y da lugar al espectro de masas.

En la **figura 26** puede verse el esquema del equipo empleado para llevar a cabo parte del desarrollo experimental de la presente memoria con sus distintas partes¹³⁶. El equipo está constituido por la interfase (ESI en este caso), la zona de “transporte y convergencia” de iones formada por skimmers, octopolos y lentes, el analizador (IT) y el detector.

¹³⁶ Esquire series. User manual vol. 1 theory. Version 5.1 (September 2002). Bruker Daltonics.

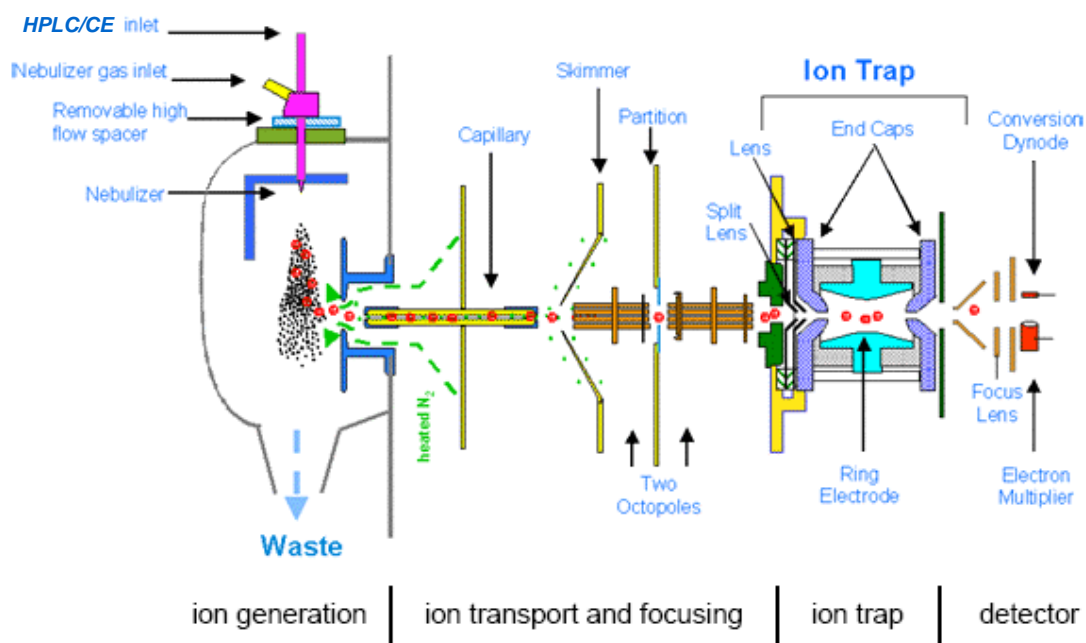


Figura 26. Esquema de un espectrómetro de masas ESI-IT

La primera zona es la cámara de formación del spray (interfase) donde, como ya se comentó en el apartado 2.8.2, se nebuliza la disolución de la muestra y se ioniza a través de un proceso de desolvatación. La zona de transporte y focalización de iones posee cuatro zonas a alto vacío, originado por una serie de bombas que posee el sistema. Los iones pasan a esta zona a través de un capilar de vidrio: el skimmer elimina el volumen del gas de secado; a continuación pasan por los octopolos que los transportan y guían desde justo detrás del skimmer hasta el detector, atravesando una serie de lentes. Por último los iones entran en el analizador de IT, que los colecta y libera en función de su relación m/z . Después del analizador, los iones pasan a la zona de detección, que tiene también una serie de lentes que dirigen los iones hasta del propio detector, y un dínodo, que permite cambiar el modo de detección de positivo a negativo.

Cuando los iones se encuentran atrapados dentro de la trampa puede llevarse a cabo tanto el análisis de sus masas (espectro de MS) como el aislamiento de uno o varios iones precursores y su posterior fragmentación (dando lugar a lo que se denomina espectros de MS/MS o espectros MS²).

El analizador IT es uno de los más usados debido a su menor coste, a su velocidad de barrido y a la posibilidad de realizar fragmentaciones sucesivas de los iones seleccionados, aunque su sensibilidad y resolución no son los mejores. Algunas de las especificaciones más destacables de la IT son:

- Rango de masas: 50-2.000 m/z .

- Resolución normal o máxima según la velocidad de barrido de 1000 a 15000 FWHM.
- Posibilidad de llevar a cabo análisis MS/MS. Permite realizar fragmentaciones sucesivas de los iones seleccionados dando lugar a espectros MSⁿ, aportando información sobre la estructura de los analitos.
- Equipo relativamente barato y que presenta menos dificultades técnicas.

2.8.3.2 Tiempo de vuelo (TOF)

En el TOF la separación se basa en un principio bastante simple: la distinta velocidad que adquieren los iones en el interior del analizador en función de su relación m/z . Si todos los iones comienzan su “vuelo” por el analizador al mismo tiempo y con la misma energía cinética, los de menor m/z llegarán al detector antes (a mayor velocidad) que los de mayor m/z ¹³⁷. Para ello es necesario emplear una fuente de ionización por pulsos ya que el uso de una fuente de ionización continua, como es ESI, puede ocasionar grandes pérdidas de intensidad. Para eliminar este problema, los iones que provienen del electrospray se introducen y aceleran en el tubo de vuelo en dirección perpendicular al eje del espectrómetro. Este diseño ortogonal en el TOF proporciona altas eficacias a la hora de transmitir en modo de pulsos los iones que vienen en forma de haz continuo; además, produce dispersiones pequeñas en la velocidad de los iones, obteniéndose una mayor resolución¹³⁸.

La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea la longitud del tubo (habrá una mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente¹⁰¹. Precisamente, el analizador TOF dispone de un dispositivo situado al final del tubo que recibe el nombre de reflector (espejo electrostático de iones) y que permite corregir la dispersión de energía de iones con el mismo valor de m/z y reenfoarlos sobre el detector, alargando sus trayectorias y mejorando la resolución¹¹⁹.

La **figura 27** nos muestra las partes que posee el TOF utilizado¹³⁹: cámara de formación del espray, unidad de desolvatación, zona de “guía y convergencia” de iones, zona de aceleración ortogonal, detector de referencia, camino o tubo de vuelo, reflector y detector.

¹³⁷ Gross, J.H., *Mass spectrometry. A textbook*, Springer, Germany, 2004.

¹³⁸ Verentchikov, A.N., Ens, W., Standlmg, K.O., *Reflecting time-of-flight electrospray ion source mass spectrometer with an and orthogonal extraction*, Anal. Chem. 1994, 66, 126-133.

¹³⁹ micrOTOFcontrol 1.1. Operator manual (May 2005). Bruker Daltonics.

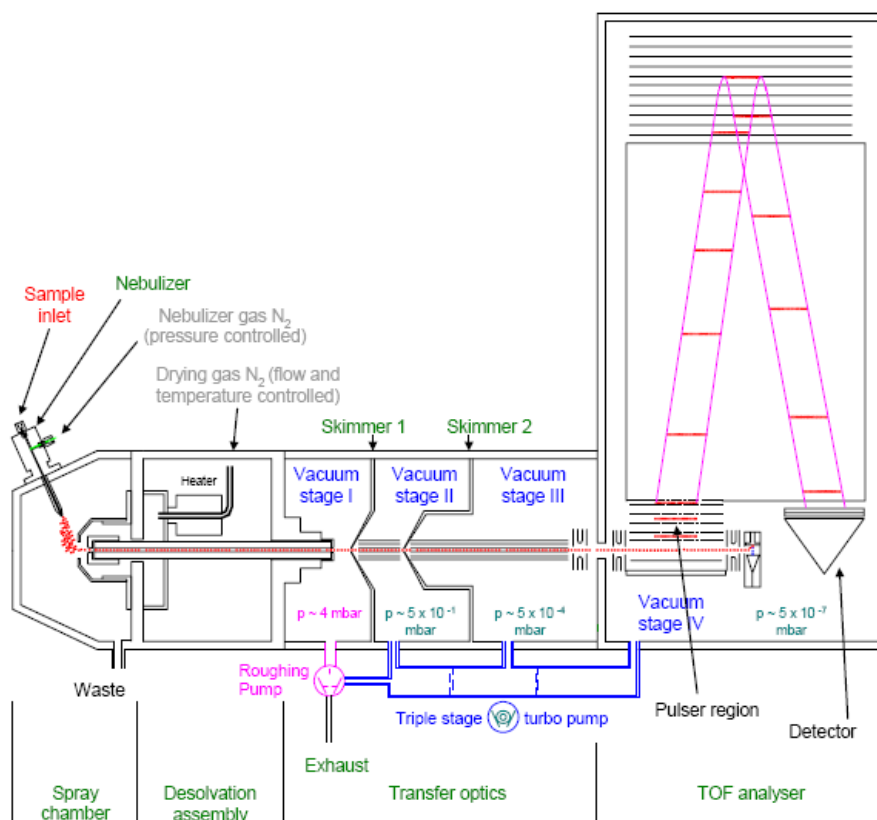


Figura 27. Esquema detallado de las partes de las que consta un ESI-TOF

La muestra entra en la cámara de nebulización, donde tiene lugar la formación del electrospray. Los iones formados atraviesan la unidad de desolvatación, que separa las zonas a presión atmosférica de la primera zona a alto vacío, y que consta de un calentador del gas de secado (generalmente N_2) y un capilar de cristal. Se llega a través de ella a la zona de transmisión o transferencia óptica que consta de tres módulos que están a alto vacío, separados entre sí por varios skimmers. El primero de los módulos (*stage I*) es el único que está conectado a una bomba externa rotatoria; mientras que los otros tres (*stages I, II y III*) están conectados a una bomba turbo molecular que posee distintos niveles de vacío. Los dos hexapolos transfieren los iones hasta la zona de alto vacío, mientras que cinco lentes enfocan o dirigen dichos iones.

La zona de aceleración ortogonal contiene dos de las lentes mencionadas (lentes 4 y 5) y acelera los iones hacia el tubo de vuelo aplicando un campo eléctrico intermitente. A continuación los iones penetran en el reflector donde se ralentizan, se paran y se reflejan. En función de su energía cinética (de su velocidad), los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector; los iones con mayor energía cinética penetrarán más en el reflector antes de ser repelidos. De esta forma se corrige la dispersión de energía de iones con la misma relación m/z , que alcanzarán el detector al mismo tiempo.

El detector de impacto electrónico consiste en una serie de placas a alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. En el detector hay millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor y cada uno de ellos trabaja como un multiplicador de electrones independiente.

El analizador TOF permite la determinación de la fórmula molecular del compuesto aplicando un método analítico bidimensional: combina la determinación de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica, dando óptimos resultados en un rango muy amplio sin requerir tediosos procesos rutinarios de re-calibración. Además de información sobre el ión molecular, el TOF puede proporcionar en determinadas circunstancias información estructural útil; dichas circunstancias se refieren a la inducción de fragmentaciones en la fuente, conocida como disociación inducida por colisión (*in-source collision induced dissociation* o ISCID)¹¹⁹.

Una de sus principales ventajas es que proporciona una resolución elevada, lo que permite obtener valores de masa molecular muy exactos; además permiten obtener espectros de masas con una transmisión iónica eficaz y proporcionan ciclos muy rápidos¹³⁷. Algunas de sus especificaciones más notables son:

- Rango de masas en modo estándar: 50-3000 *m/z*.
- Resolución: 10.000 FWHM en modo normal y 15.000 FWHM en modo focus.
- Buena exactitud de masas: 3 ppm con calibración interna y 5 ppm con calibración externa.

2.8.3.3 Cuadrupolo-tiempo de vuelo (Qq-TOF)

La MS permite el acoplamiento de varios analizadores en serie; la técnica resultante se conoce como *espectrometría de masas en tándem* (MS/MS) y es capaz de proporcionar tanto la masa molecular del analito, como información estructural acerca del mismo¹¹⁹. Para conseguir dicho objetivo, un determinado ión de interés (fragmento o ión molecular) se selecciona y aísla en el primer analizador para ser posteriormente introducido en la cámara de colisión. Por choque con el gas de colisión, la energía cinética de los iones seleccionados se transforma en energía vibracional, y los iones se fragmentan. Estos fragmentos pasan al segundo analizador de masas donde se separan y analizan.

Las técnicas de ionización blandas, como es el caso de la ESI, inducen poca fragmentación en la molécula, aportando una información estructural insuficiente de la misma, por lo que el empleo de la MS en tándem resulta muy interesante. Uno de los

instrumentos más usados es el QqQ (donde la “q” minúscula hace referencia a la celda de colisión), aunque existen otros, entre los que destaca el espectrómetro de masas híbrido Qq-TOF empleado en uno de los trabajos desarrollados en esta memoria. En el siguiente esquema (**fig. 28**) se muestran las distintas partes que posee el Qq-TOF¹⁴⁰.

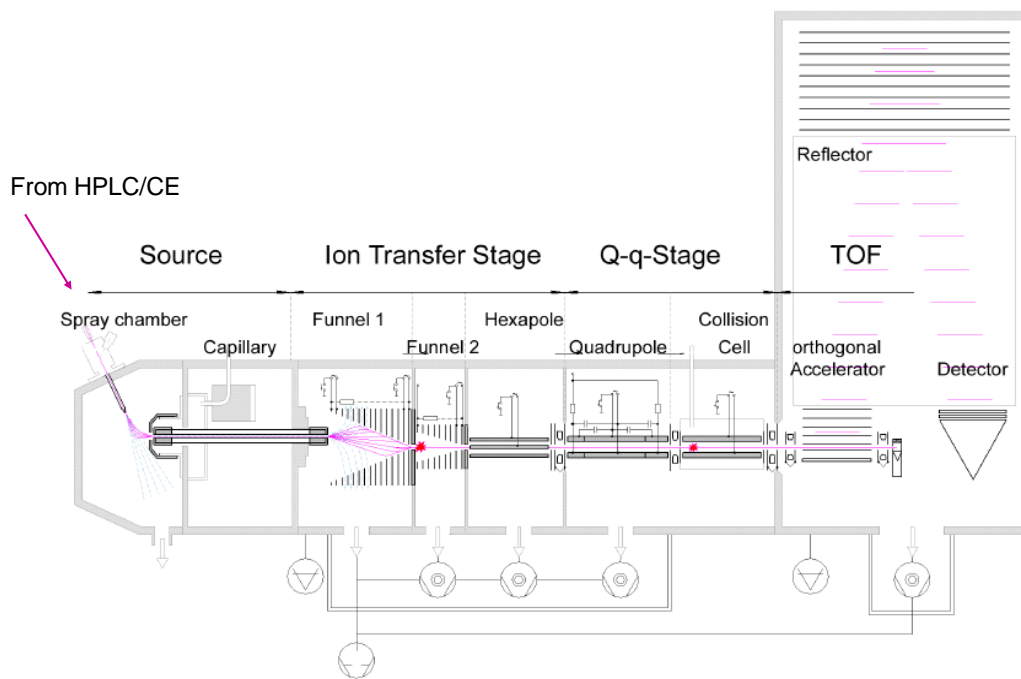


Figura 28. Esquema detallado de las partes de las que consta un ESI-Qq-TOF

El esquema es similar al que se vio en el sistema ESI-TOF: cámara de formación del spray, unidad de desolvatación, zona de transferencia de iones, cuadrupolo, celda de colisión, zona de aceleración ortogonal, tubo de vuelo, reflector y detector. En la unidad de desolvatación se encuentra el capilar de cristal a través del cual los iones son transferidos desde la cámara de ionización (presión atmosférica) a la primera etapa de vacío del sistema, la zona de transferencia. En esta zona encontramos la primera diferencia importante con respecto al diseño del TOF, los dos skimmers se han sustituido por un nuevo diseño tipo funnel (anillos concéntricos apilados con forma de embudo) que evita que se pierdan iones, mejorando la transmisión iónica y aumentando la sensibilidad. Después de los dos funnels se encuentra un hexapolo que guía y converge los iones hacia el primer analizador de masas, el cuadrupolo. En éste se seleccionan y guían los iones que se quieren fragmentar hacia la celda de colisión, donde se produce la fragmentación por colisión (CID) entre los iones y el gas residual introducido. Los iones y sus fragmentos se

¹⁴⁰ micrOTOFQ. User manual. Version 1.1 (April 2007). Bruker Daltonics.

aceleran en el acelerador ortogonal¹⁴¹ y se introducen en el tiempo de vuelo, donde se separan en función de su relación m/z de la misma manera que veíamos en la descripción del TOF.

El analizador Qq-TOF, con la posibilidad de hacer MS/MS, añade un tercer nivel de información, que se une a la exactitud de masas y a la distribución isotópica, para llevar a cabo la identificación de compuestos¹⁴². Algunas de sus especificaciones más notables son:

- Rango de masas en modo estándar: 50-20.000 m/z .
- Alta resolución 17.500-20.000 FWHM.
- Posibilidad de llevar a cabo análisis MS/MS.
- Combina exactitud de masas (3 ppm con calibración interna y 5 ppm con calibración externa) y distribución isotópica, tanto de precursores como de fragmentos, permitiendo la determinación de su fórmula molecular.
- Excelente sensibilidad, con la tecnología funnel.
- Buena reproducibilidad en todo el rango de masas.

2.9 Identificación y cuantificación

Toda determinación cuantitativa se basa en la medida de alguna propiedad relacionada, directa o indirectamente, con la cantidad del componente de interés presente en la muestra.

Los métodos espectrofotométricos proporcionan una aproximación cuantitativa del total de compuestos fenólicos (o de alguna de sus familias) contenidos en una muestra. Los ensayos de Folin-Denis y Folin-Ciocalteu, usados para la determinación de fenoles totales, se basan en la generación de color cuando los reactivos de Folin-Denis y Folin-Coicalteu, respectivamente, se reducen al ponerse en contacto con la muestra en medio alcalino. Dichos reactivos no son específicos por lo que pueden reaccionar con cualquier agente reductor presente en la muestra. Otros ejemplos son el método de la vanillina, usado en la cuantificación de flavan-3-ols, dihidrochalconas y proantocianinas, y el de complejación con Al (III), que se utiliza para ácido cafeico, flavonoides y taninos totales⁴⁶.

¹⁴¹ Bristol, T., Constantine, J., Harrison, M., Cavoit, F., *Performance optimisation of a new-generation orthogonal-acceleration quadrupole-time-of-flight mass spectrometer*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008, 22, 1213-1222.

¹⁴² Chernushevich, I.V., Lobota, A.V., Thomson, B.A., *An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. 2001, 36, 849-865.

En general, los métodos espectrofotométricos son rápidos, sencillos, de buena reproducibilidad y precisión aceptable, especialmente útiles en el control de rutina, pero debido a su poca especificidad, suelen dar sobreestimaciones en la cantidad de compuestos fenólicos contenida en la muestra. Esto, junto con el interés por identificar cada uno de los analitos individualmente, propició el remplazo de la espectrofotometría por las técnicas separativas.

Cuando se emplean las técnicas separativas, una vez separados los compuestos, su identificación se hará mediante el estudio detallado de los datos obtenidos en el análisis, su comparación con los patrones y la información disponible en bibliografía. Los datos experimentales se buscan manualmente en las publicaciones y en las bases de datos existentes de libre acceso (PubChem <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, Kegg Ligand Database <http://www.genome.jp/kegg/ligand.html>, Metlin <http://metlin.scripps.edu/>, MassBank <http://www.massbank.jp/> o SciFinder Scholar <https://scifinder.cas.org/> entre otras), con lo cual es un proceso manual largo y tedioso.

Cuando se utiliza la MS, el empleo de métodos semi-automáticos de búsqueda en bases de datos de espectros de masas construidas usando las mismas condiciones en las que se realiza el análisis de la muestra agiliza enormemente el proceso. Hoy día, esta metodología está bien establecida para la identificación de compuestos mediante GC-MS con ionización por impacto electrónico, sin embargo, en el caso de HPLC-MS o CE-MS, la estandarización es casi imposible; el gran número de compuestos fenólicos existentes en los distintos alimentos y la gran diversidad de métodos analíticos usados para su análisis son los grandes retos a la hora de construir una base de datos amplia y universal. Uno de los mayores inconvenientes en el uso de este tipo de bases de datos es que el número de compuestos que contiene suele ser muy limitado, pues sólo se añaden aquellos que están disponibles en el mismo laboratorio. Además, todos los compuestos a incluir en la base de datos deben ser analizados en las mismas condiciones y los espectros de masas introducidos uno a uno. Aún así, todas estas dificultades se ven compensadas por la rapidez y la fiabilidad a la hora de realizar la identificación¹⁴³.

Utilizando la absorción UV-Vis como sistema de detección, es imprescindible el uso de patrones para poder comparar los tiempos de retención y los espectros de absorción, e incluso para dopar la muestra; aún así, con este sistema es difícil de conseguir la

¹⁴³ Fredenhagen, A., Derrien, C., & Gassmann, E., *An MS/MS library on an iontrap instrument for efficient dereplication of natural products. Different application patterns for [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ ions.* J. Nat. Prod. 2005, 68, 385-391.

identificación inequívoca. En el caso de MS y NMR, al proporcionar información estructural de las moléculas, el uso de patrones no es tan esencial. No obstante, solamente se podrá conseguir la caracterización química completa de una molécula combinando la información obtenida mediante distintas plataformas analíticas (**fig. 29**).

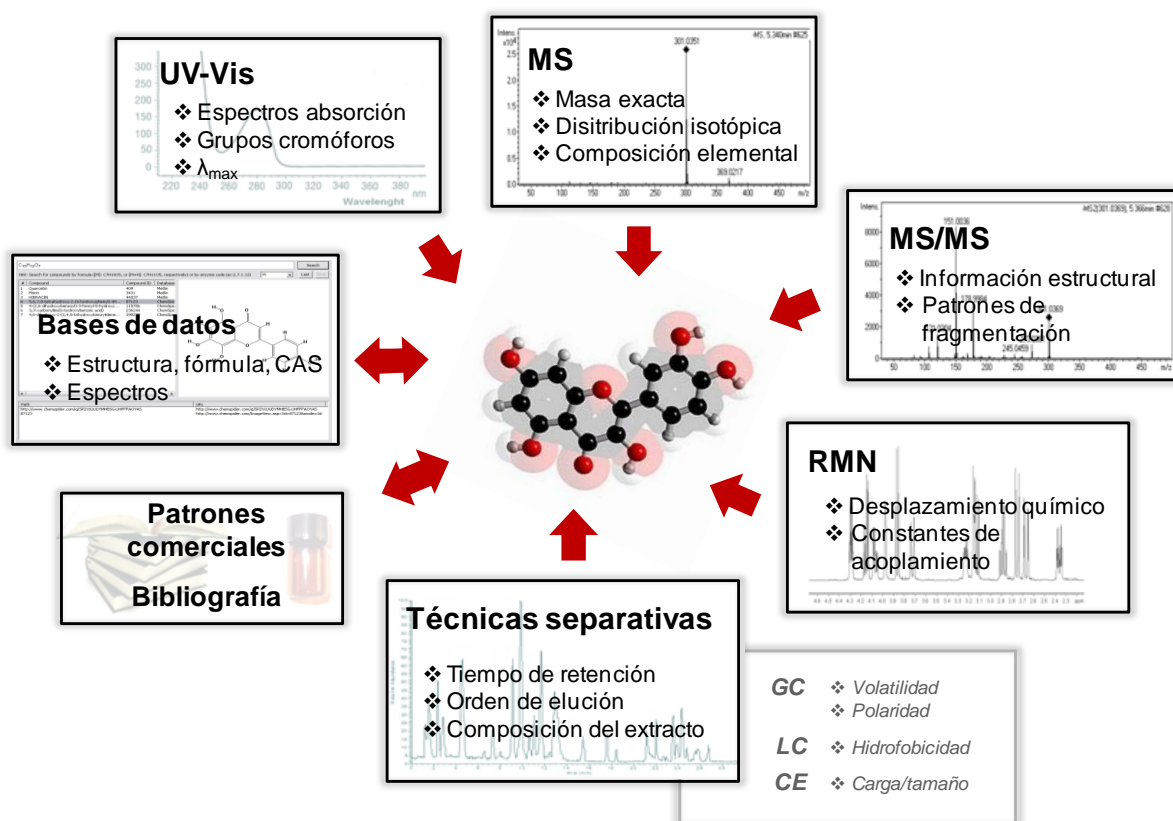


Figura 29. Datos obtenidos mediante distintas plataformas analíticas y fuentes de información disponibles que conducen a la identificación de un determinado compuesto¹⁴⁴

Para llevar a cabo la cuantificación veraz de los compuestos fenólicos identificados en una muestra es necesario disponer de patrones comerciales. La disponibilidad de patrones de referencia para este tipo de compuestos es limitada y se han seguido distintas estrategias para solucionar este problema: **i)** obtener los compuestos relevantes mediante síntesis o aislarlos usando cromatografía preparativa, **ii)** llevar a cabo la cuantificación utilizando compuestos pertenecientes a la misma familia o de características similares, que sí estén disponibles comercialmente⁴⁸.

¹⁴⁴ Moço, S.I.A.V, Tesis Doctoral: *Metabolomics technologies applied to the identification of compounds in plants. A liquid chromatography-mass spectrometry / nuclear magnetic resonance perspective over the tomato fruit*, Wageningen University, The Netherlands, 2007.

En el análisis de alimentos, la mayoría de las muestras objeto de estudio son muy complejas en composición y si tienen que examinarse muchas muestras, su comparación a simple vista resulta difícil. Los métodos de análisis estadístico multivariante resultan extremadamente útiles en este sentido, al ser capaces de reducir la dimensionalidad de los datos sin perder información. En el análisis de compuestos fenólicos se han utilizado técnicas como los mínimos cuadrados parciales (PLS) o el análisis por componentes principales (PCA)⁴⁶.

**PARTE EXPERIMENTAL.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

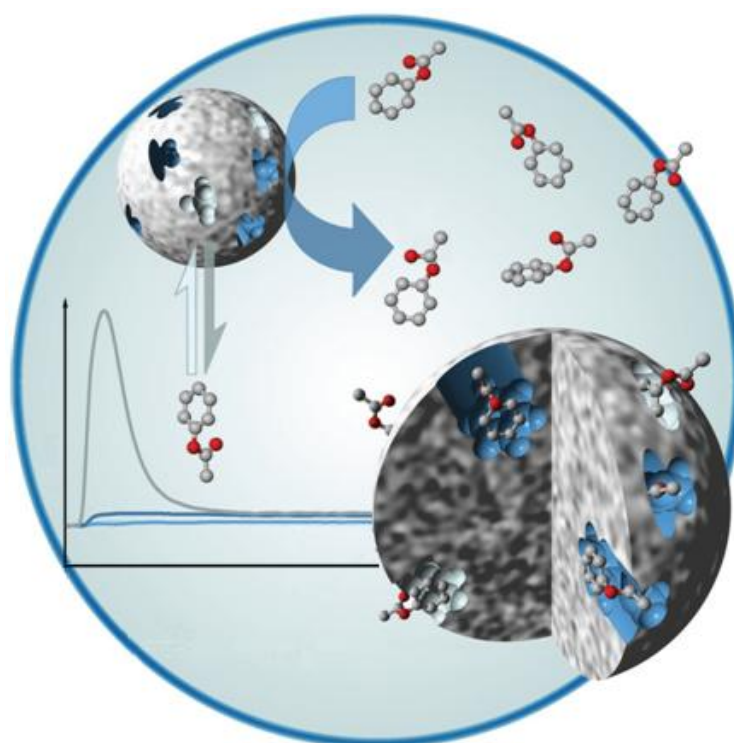
Esta segunda sección denominada “*Parte experimental. Resultados y discusión*” se divide en cuatro bloques temáticos, que corresponden con las distintas estrategias que se han desarrollado en esta tesis doctoral: en el primer bloque se aborda la extracción selectiva de compuestos fenólicos utilizando fases sólidas basadas en MIPs; los bloques temáticos II y III versan sobre la puesta a punto de métodos separativos mediante CE y HPLC, respectivamente, para la detección de compuestos fenólicos en dos matrices de origen vegetal; por último, en el cuarto bloque se describe el desarrollo de una base de datos de espectros de masas para facilitar y agilizar la etapa de identificación de este tipo de compuestos.

Los bloques temáticos se han dividido en diferentes capítulos. Así, los bloques I y IV contienen un único capítulo, mientras que los bloques II y III se han dividido en dos capítulos, siendo el primero de ellos una revisión bibliográfica acerca del análisis de compuestos fenólicos en propóleo y tomate, respectivamente. Los capítulos constan de una pequeña introducción en la que se comentan las motivaciones para llevar a cabo el trabajo (experimental), los pasos seguidos para alcanzar los objetivos planteados y los resultados que se obtuvieron. Tras ella, se adjunta el artículo, ya publicado o en proceso de revisión, obtenido como consecuencia del trabajo (experimental) realizado; además, en el caso de los bloques I y IV, al capítulo le sigue un anexo con información adicional.

La parte correspondiente a los materiales y métodos empleados en el desarrollo experimental de la presente memoria se especifica en cada uno de los capítulos. Aún así, y debido a la relevancia actual de las plataformas analíticas basadas en el acoplamiento de una técnica separativa con la espectrometría de masas para abordar numerosos problemas en distintos ámbitos (alimentario, ambiental, bioquímico...), a continuación se detalla la instrumentación empleada:

- ✓ CE: P/ACE™ System MDQ Capillary Electrophoresis (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, EEUU).

- ✓ HPLC: Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA). Equipado con un desgasificador, una bomba binaria, un automuestreador, un compartimento termostatzado para la columna cromatográfica y un detector diodo-array (DAD).
- ✓ RRLC: Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC, (Agilent Technologies, Palo Alto, Ca, USA). Equipado con un desgasificador, una bomba binaria, un automuestreador, un compartimento termostatzado para la columna cromatográfica y un detector diodo-array (DAD).
- ✓ Espectrómetros de masas:
 - Analizador trampa de iones: modelo Bruker Daltonics Esquire 2000TM IT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).
 - Analizador tiempo de vuelo: modelo micrOTOFTM (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).
 - Analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo: modelo micrOTOFQTM (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).
- ✓ Acoplamientos utilizados:
 - CE-ESI-IT-MS (capítulo 3).
 - CE-ESI-TOF-MS (capítulo 3).
 - RRLC-DAD (capítulo 5).
 - RRLC-ESI-IT-MS (capítulo 5).
 - RRLC-ESI-TOF-MS (capítulo 5).
 - HPLC-ESI-Qq-TOF (capítulo 6).



BLOQUE TEMÁTICO I
DESARROLLO DE MIPs
PARA LA EXTRACCIÓN SELECTIVA
DE COMPUESTOS FENÓLICOS

CAPÍTULO 1

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE UN MIP COMO MATERIAL ADSORBENTE PARA LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE HIDROXITIRO SOL

Este primer bloque temático versa sobre el diseño y el desarrollo de polímeros de impronta molecular (MIPs) para la extracción selectiva de compuestos fenólicos de matrices complejas. Los pasos seguidos se enumeran a continuación:

1. *Selección del compuesto a extraer.* Para ello se tuvieron en cuenta principalmente dos aspectos: el interés que genera el compuesto (ej. por sus propiedades beneficiosas sobre la salud) y su relativa accesibilidad (es conveniente usar moléculas molde que estén disponibles como estándares comerciales puros a precio asequible).

2. *Síntesis y caracterización de MIPs que interaccionen selectivamente con el compuesto fenólico seleccionado.* El presente trabajo describe la síntesis de un polímero impreso no covalentemente empleando hidroxitirosol (HTY) como molécula molde, 4-vinilpiridina (VP) como monómero funcional, etilenglicol dimetacrilato (EDMA) como entrecruzador y acetonitrilo como porógeno mediante un procedimiento de polimerización en disolución. A la vez que el MIP, se sintetizó un polímero de control no impreso (NIP), usando las mismas condiciones pero en ausencia de molécula molde.

La caracterización de los sitios de unión del MIP se llevó a cabo mediante estudios de distribución de afinidad¹⁴⁵. Para ello, se tomaron distintas concentraciones de HTY y una cantidad constante de polímero (MIP y NIP), incubando las mezclas durante 24 h con agitación continua; se midió entonces la cantidad de HTY libre presente en el líquido

¹⁴⁵ Rampey, A.M., Umpleby, R.J., Rushton, G.T., Iseman, J.C., Shah, R.N., Shimizu, K.D., *Characterization of the imprinting effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich isotherm-affinity distribution analysis*, Anal. Chem. 2004, 76, 1123-1133.

sobrenadante empleando medidas de absorbancia. Los datos experimentales obtenidos se ajustaron matemáticamente al modelo de isothermas de adsorción más adecuado.

En el caso de los MIPs, la isoterma de adsorción más utilizada para ajustar los datos es la de Freundlich, tanto en forma exponencial como en formato logarítmico. En este último formato, si el modelo de Freundlich es el adecuado para la descripción del sistema, ésta se ajustará a una línea recta en el intervalo de concentraciones seleccionado.

La representación de $\log B$ (concentración de HTY retenido) en función de $\log C$ (concentración de HTY libre en el líquido sobrenadante) generó una línea recta, a partir de la cual se extrajeron los denominados parámetros de Freundlich. Con estos parámetros, y mediante las expresiones matemáticas descritas en el trabajo, se calcularon las constantes de afinidad y la densidad de los sitios de unión tanto del MIP como del NIP, y pudo demostrarse la existencia del efecto de impronta.

Además, se han sintetizado una serie MIPs, con sus correspondientes NIPs, empleando diferentes condiciones de síntesis y técnicas de polimerización, y utilizando otros compuestos fenólicos como molécula molde: catecol, tirosol y los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico. Se ha empezado a evaluar algunos de ellos, sin haber obtenido resultados satisfactorios hasta el momento, mientras que otros todavía no han podido ser evaluados. En el anexo de este bloque temático se recoge una relación de los polímeros sintetizados, de las condiciones de polimerización empleadas y de la caracterización hecha .

3. Selección de los disolventes adecuados en el proceso de SPE (acondicionamiento del cartucho, carga, lavado y elución). La selección debe hacerse para generar interacciones específicas entre el MIP y el HTY, de forma que se obtenga la máxima recuperación posible del HTY en el MIP y se minimice dicha recuperación en el NIP. Se evaluó la selectividad del MIP hacia el HTY utilizando otros 8 compuestos fenólicos relacionados estructuralmente con él, y 4 disolventes, o mezclas de disolventes, de distinta polaridad para realizar las etapas de carga y de lavado. Los compuestos evaluados poseen grupos hidroxilo y/o carboxilo capaces de interactuar inespecíficamente con la matriz polimérica. Los resultados de este análisis demostraron, una vez más, la creación de sitios de unión específicos para el HTY en el MIP, utilizando acetonitrilo o acetonitrilo/cloroformo (1:3, v/v) para la carga de los compuestos y el lavado.

El efecto de los diferentes disolventes usados en las etapas de carga y lavado sobre la capacidad de retención del MIP fueron explicados introduciendo los parámetros de

solubilidad de Hansen¹⁴⁶. Mediante esta aproximación, se han discutido las posibles interacciones dispersivas, polares y por puentes de hidrógeno que tienen lugar entre el disolvente, los analitos y la fase adsorbente. Las distintas interacciones analitos-MIP y analitos-NIP que se observan, vuelven a poner en evidencia el efecto de impronta.

Los procedimientos aplicados para la síntesis de un MIP (mediante polimerización en disolución) y su posterior evaluación como fase sólida para la extracción de HTY, se muestran esquematizados en la **figura 1.1**:

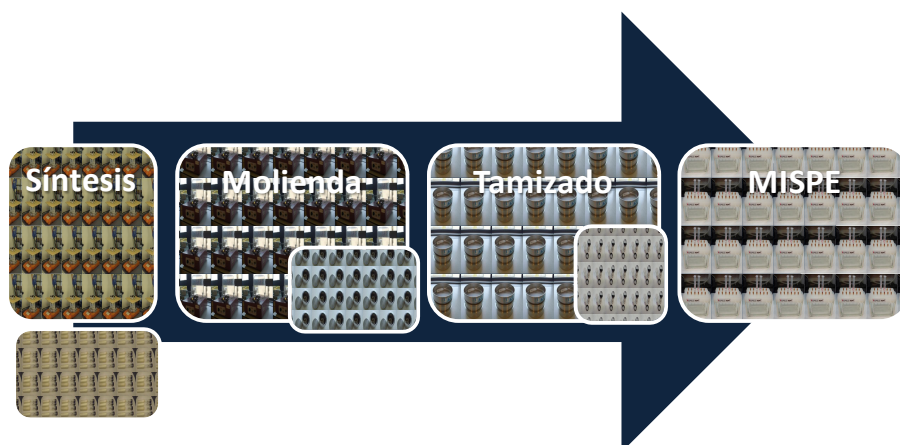


Figura 1.1. Etapas principales e instrumentación utilizada en la síntesis de un MIP para la SPE de HTY

4. MISPE para la extracción de HTY de aceite de oliva. Los resultados obtenidos en los estudios de las isotermas de adsorción y en el proceso MISPE con una mezcla de estándares revelaron que el MIP sintetizado es capaz de retener selectivamente HTY, por lo que se probó como material adsorbente para extraer HTY de una matriz tan compleja como es el aceite de oliva (**figura 1.2**).

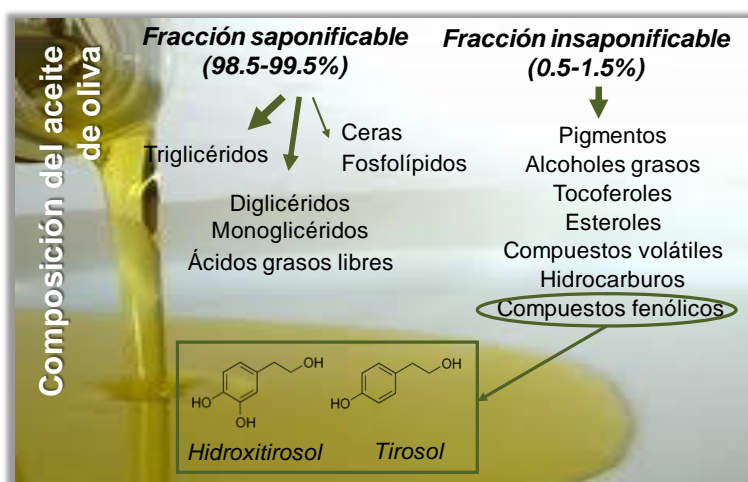


Figura 1.2. Esquema de la composición química del aceite de oliva

¹⁴⁶ Hansen, C., *Hansen Solubility Parameters: A user's handbook*, 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, FL, 2007.

La capacidad de extracción del MIP se comparó con la de un cartucho Diol comercial, siendo el primero capaz de retener mayores cantidades tanto de HTY como de tirosol (TY, misma estructura que el HTY pero con un grupo hidroxilo menos).

La síntesis de los polímeros fue llevada a cabo durante una estancia en el Departamento de Química Pura y Aplicada de la Universidad de Strathclyde, en Glasgow, Reino Unido, mientras que la evaluación del MIP para la extracción selectiva de HTY se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada.

El artículo que ha dado lugar este trabajo se ha enviado para su publicación en la revista *Journal of Chromatography A* bajo el título "***Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer as sorbent for the solid-phase extraction of hydroxytyrosol***".

Synthesis and evaluation of a molecularly imprinted polymer as sorbent for the solid-phase extraction of hydroxytyrosol

María Gómez-Romero¹, Ángel Valero-Navarro¹, Peter A.G. Cormack², Antonio Segura-Carretero¹, Alberto Fernández-Gutiérrez¹

¹ Department of Analytical Chemistry, University of Granada, c/ Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

² WestCHEM, Department of Pure and Applied Chemistry, University of Strathclyde, 295 Cathedral Street, Glasgow G1 1XL, UK

Abstract

A non-covalent molecularly imprinted polymer (MIP) able to bind hydroxytyrosol (HTY), a well-known phenolic compound present in virgin olive oil (VOO) with recognised antioxidant properties, was synthesised and evaluated as selective sorbent in solid-phase extraction (MISPE). The binding properties of HTY to molecularly imprinted and non-imprinted polymers in two different solvents were investigated by Freundlich isotherm-affinity distribution analysis. The MIP selectivity and specific binding capacity were further evaluated by means of a MISPE procedure using eight structurally related compounds. It was demonstrated that the conditions chosen for loading and washing the polymer are extremely important for ensuring good recovery. Hansen solubility parameters of the solvents and analytes used in the study were calculated in order to assist the demonstration of the imprinting effect. The MIP was compared with a commercially available SPE-Diol sorbent material for the selective isolation of HTY and TY from VOO, enabling the extraction of higher amounts of both compounds

Keywords: Molecularly imprinted polymers / hydroxytyrosol / solid-phase extraction / affinity distribution analysis / Hansen solubility parameters.

1. Introduction

The need for separation of specific compounds from complex mixtures has led to an increase in the development and use of molecularly imprinted polymers (MIPs), which are synthetic materials with artificially generated recognition sites able to specifically rebind a target molecule in preference to other closely related compounds. In short, a MIP is prepared by mixing the template molecule, which usually is the target molecule, with functional and cross-linking monomers and a radical initiator in a proper solvent, or mixture of solvents. The monomers are chosen considering their ability to interact with the functional groups of the template molecule. The pre-polymerisation complexes formed between the template molecule and the functional monomers are stabilised during polymerisation, leading to form stable binding cavities in a rigid, highly cross-linked three-dimensional network. After polymerisation, the template molecule is extracted and the formed cavities are complementary to the target analyte in shape, size and functionality, thereby serving as recognition sites for the template used [1]. In general, MIPs demonstrate very good thermal and chemical stability; they can be subjected to repeated operations of binding and washing without loss of activity and their synthesis is a relatively easy and cheap procedure. These qualities have made molecular imprinting an attractive technique for the synthesis of artificial receptor-like structures in many fields of chemistry and biology, particularly as an affinity material for sensors [2,3,4], chromatography [5] and catalysis [6]. Nonetheless, their use in solid-phase extraction (the so-called molecularly imprinted solid-phase extraction or MISPE) is nowadays one of the major application areas of MIPs [7,8,9].

SPE consists of several steps: conditioning, sample loading, washing and elution. In MISPE the selection of solvents is dependent on the kind of monomer-template interactions that took place during polymerisation and also on the porogen used. The loading solvent is chosen in order to optimise the interactions template-monomer, allowing the rebinding of the analyte to the specific sites. The washing step is carried out to maximise those specific interactions with the simultaneous elution of interfering compounds non-specifically retained in the polymeric matrix, and usually the solvent used is the same as in the sample loading. Finally, the elution solvent should be

optimised taking into account its ability to disrupt the template-monomer interactions formed [10].

MISPE has been extensively applied to the extraction of several compounds from different matrices, such as pollutants from environmental samples (water or soils), molecules of biological interest in biological samples (biofluids or tissue samples) [11] and hazardous residues in food [12]. Nevertheless, the number of publications related to the imprinting of phenolic compounds is relatively low. Some examples include the selective extraction of epicatechin from tea [13], quercetin from wine [14,15] and ginkgo leaves [16] or protocatechuic acid from *Melissa officinalis* [17].

Among phenolic compounds, hydroxytyrosol (HTY) has become of increasing interest due to the broad spectrum of biological activities based on the antioxidant properties that it exerts, such as cancer chemoprevention, cardioprotection and anti-atherogenic activity, anti-inflammatory properties or skin photoprotection [18,19,20,21]. HTY is one of the main phenolic compounds in virgin olive oil (VOO) [22] and easily available from the olive mill wastewaters [23]. Its beneficial effects on human health are stimulating the development of new extraction and purification methods from such complex matrices. In particular, MISPE used to separate or pre-concentrate analytes of interest presents the advantages of both techniques: the high specificity, selectivity and sensitivity of the molecular recognition mechanism and the high resolving power of separation methods. Herewith we report our preliminary investigations into the manufacturing of a MIP and its use as SPE sorbent for HTY.

To our knowledge, only one imprinting approach for HTY has been reported [24]. The MIP was synthesised via thermally initiated polymerisation using HTY as template molecule, methacrylic acid and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) as functional monomer and cross-linker, respectively.

The present work deals with the evaluation of a new imprinted-material synthesised by monolith polymerisation using 4-vinylpyridine (VP) as functional monomer and EDMA as cross-linker. The polymer was characterised by Freundlich isotherm-affinity distribution analysis and its capacity and changes in its binding strength were evaluated by varying the nature and composition of the solvent. The performance of

the MIP was evaluated towards eight related phenolic compounds of HTY by means of a MISPE procedure using solvents with different polarities in the loading and washing steps. Hansen solubility parameters and its components corresponding to dispersive, polar and hydrogen bonding interactions were used to express the relationships between solvent, analyte and sorbent, and to aid the demonstration of the imprinting effect. The applicability of the synthesised MIP, as an alternative to a conventional SPE sorbent material for the selective isolation of HTY from VOO, was studied as well.

2. Experimental

2.1. Chemicals

4-vinylpyridine (VP) and ethylene glycol dimethacrylate (EDMA) were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium) and Sigma Aldrich (Steinheim, Germany), respectively. They were freed from inhibitors by passage through a column of neutral alumina and dried over MgSO₄. 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) was purchased from Sigma Aldrich and purified by recrystallisation from methanol. All reagents were stored at 0°C.

Solvents were of HPLC or analytical grade. Acetonitrile (MeCN), purchased from Sigma, was dried over molecular sieves for the polymerisation. Acetone, toluene and acetic acid (AAC) were purchased from Sigma Aldrich, chloroform from Lab-Scan (Gliwice, Poland) and methanol (MeOH), 1,4-dioxane (dioxane) and n-hexane from Panreac (Barcelona, Spain). Water used for HPLC was doubly distilled with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA). MeCN and water with 0.5 % of AAC were filtered for HPLC analysis.

Hydroxytyrosol, 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)ethanol (HTY), was purchased from TCI Europe (Antwerp, Belgium); tyrosol (TY) and catechol (CAT) from Fluka (Buch, Switzerland); *p*-coumaric acid (COUM), cinnamic acid (CIN) and caffeic acid (CAF) from Sigma Aldrich; and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid (DPPAC) and 3-(4-hydroxyphenyl)propanoic acid (HPPAC) from Alfa Aesar (Heysham, Lancashire, UK).

2.2. Preparation of the polymers

The HTY-MIP was prepared by bulk polymerisation. HTY (1.1 mmol) was dissolved in 6.67 ml of the dry solvent (MeCN) in a thick-walled glass tubes (10 ml Klimax culture). The functional monomer VP (4.6 mmol), the cross-linker EDMA (22.8 mmol) and finally the initiator AIBN (0.1 mmol) were then added to the solution. The solution was ultrasonicated, then purged with nitrogen gas during 10 min while cooling on an ice bath (0°C) and sealed under nitrogen. Thermal polymerisation was carried out in an oil bath set at 60°C for 24 h. The same procedure without adding the template was used to prepare a non-imprinted polymer (NIP) for control experiments.

The obtained polymer monoliths were ground mechanically, first in a mortar and then in a ball mill (Fritsch pulverisette type 06102, Germany). The particles were separated by size through repeated wet sieving in acetone using Fisherbrand test stainless steel sieves with 25 and 38 µm apertures. The polymers were freed of fines by sedimenting them in acetone (after 30 min the supernatant was discarded and the process was repeated twice more). The precipitated polymer particles were dried in vacuo overnight at 40°C.

2.3. Batch rebinding studies to evaluate the affinity distribution (AD)

Batch rebinding studies were carried out in order to evaluate the affinity distribution (AD) and consequently, the binding properties of MIP and NIP in two different solvents (mixtures of MeCN/chloroform (1:3, v/v) and pure MeCN). From these experiments, the corresponding adsorption isotherms were generated. They show the relationship between the equilibrium concentration of bound and free guest over a certain concentration range. Thus, an amount of 8 mg of MIP or NIP was added to 4 ml of an individual HTY solution (HTY content between 1 and 50 µg ml⁻¹ in MeCN/chloroform (1:3, v/v) and HTY content between 5 and 50 µg ml⁻¹ in pure MeCN) in a 10 ml thick-walled glass vial, sealed and then shaken in an orbital shaking platform for 24 h at room temperature. Afterwards, they were centrifuged and the HTY content remaining in the supernatant was determined by UV-Vis absorbance at 280 nm. The quantity of

adsorbed HTY was calculated by subtracting the free concentration after equilibrium from the total.

The experimental binding data for this study were modelled with the Freundlich isotherm (FI) equation, which is a power function of concentration according to

$$B(C) = aC^m \quad (1)$$

where B and C are the concentration of bound and free analyte, respectively, and a and m are fitting constants that have physical meaning [25]. The constant m is particularly interesting, as it is the heterogeneity index. Its value ranges from 0 to 1 and increases as heterogeneity decreases. The broad applicability of the FI to non-covalent MIPs has already been demonstrated [26].

The FI is most easily applied by plotting experimental binding data in log format. Isotherms that are well-modelled by the FI fall on a straight line (eq. (2)) and thus, the binding parameters can be extracted using ordinary linear regression.

$$\log B = m \log C + \log a \quad (2)$$

Application of the FI also enables the facile calculation of the corresponding AD using eq. 3, where a and m are the Freundlich fitting parameters, K is the affinity constant (K can be assumed as equal to $1/C$) and $N(K)$ is the number of binding sites with a given affinity [27].

$$N(K) = 2.303am(1 - m^2)K^{-m} \quad (3)$$

From this equation, two additional binding parameters can be calculated, the number of binding sites ($N_{K_{min}-K_{max}}$) and the weighted average affinity ($K_{K_{min}-K_{max}}$), where a and m are equivalent to Freundlich parameters:

$$N_{K_{min}-K_{max}} = a(1 - m^2)(K_{min}^{-m} - K_{max}^{-m}) \quad (4)$$

$$K_{K_{min}-K_{max}} = \left(\frac{m}{1-m} \right) \left(\frac{K_{min}^{1-m} - K_{max}^{1-m}}{K_{min}^{-m} - K_{max}^{-m}} \right) \quad (5)$$

ADs calculated with eq. 3 are valid only within a certain range of binding affinities, which are defined by the concentration limits of the experimental binding isotherm.

These limits (K_{min} and K_{max}) are set by the maximum (C_{max}) and minimum (C_{min}) free concentrations according to the expressions $K_{min}=1/C_{max}$ and $K_{max}=1/C_{min}$.

2.4. MISPE procedures

First, a polyethylene frit (20 μm in porosity size) was placed on the bottom of the empty polypropylene SPE cartridge (6 ml in total volume), both from Supelco (Sigma-Aldrich Analytical). Then, 100 mg of MIP or NIP (25-38 μm particle size) in 5 ml of acetone were wet-packed into the cartridge and finally another frit was placed on top of the polymer.

To evaluate the selectivity of the synthesized polymer and possible interferences in the extraction process, eight phenolic compounds structurally closely related to HTY (**Fig.1**) were used to carry out the SPE experiments.

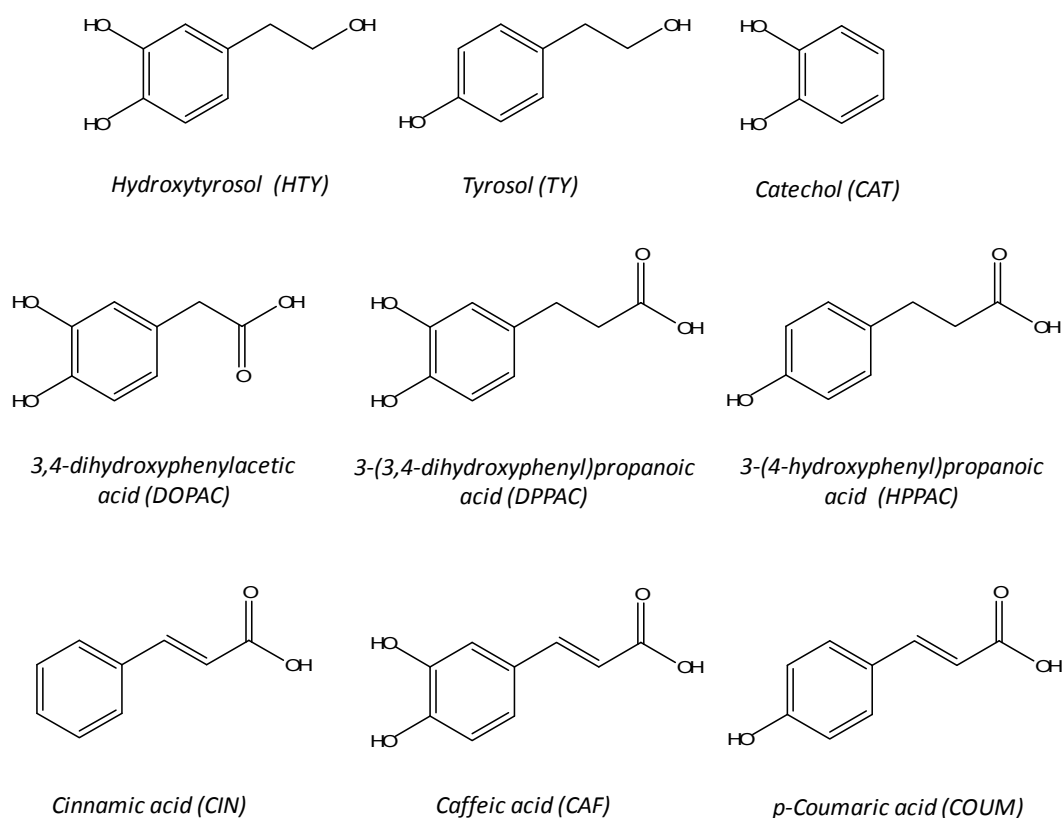


Figure 1. Structures of the template (HTY) and its structurally related compounds (TY, CAT, DOPAC, DPPAC, HPPAC, CIN, CAF and COUM)

Prior to each use, the cartridge was washed with 5 ml of MeOH/AAC (9:1, v/v) and with another 5 ml of pure MeOH in order to eliminate the remaining AAC from the binding sites. The cartridge was conditioned with the same solvent used for the sample loading. Several solvents were tested to study the cartridge binding capacity: pure MeCN and MeCN with the addition of less polar solvents (chloroform, toluene and dioxane) in the proportion 1:3, v/v. 1 ml of the standard mixture (0.05 mM of each phenolic compound dissolved in the corresponding solvent) was then loaded onto the SPE cartridge. Subsequently, the cartridge was washed with 1 ml of the loading solution and the compounds were eluted using 5 ml of MeOH/AAC (9:1, v/v). All the solvents were passed through the cartridge by the gravity force alone. The collected load-solution, rinsed solution and eluates were evaporated to dryness at 40°C under vacuum and the residues were redissolved in 250 µl of MeOH for HPLC-UV analysis.

To perform the quantitative determinations, calibrations curves for each compound were constructed. Extraction recoveries and specific binding capacities were calculated.

2.5. SPE procedure and extraction of phenolic compounds from VOO

The SPE protocol for the isolation of the phenolic fraction was adapted from a previous paper of our research group [28]. The behaviour of the packed MIP cartridge was compared with that of a DSC-Diol cartridge (100 mg). The cartridges were conditioned by passing 1 ml of MeOH and then 1 ml of hexane. VOO (6 g) was dissolved in 6 ml of hexane and passed through the columns. The cartridges were washed with three portions (1.5 ml) of hexane, which were then discarded in order to remove the nonpolar fraction of the oil. Finally, the samples were recovered by passing through three portions (4 ml) of MeOH/AAC (9:1, v/v) and brought to dryness in a rotary evaporator under reduced pressure at a temperature of 40°C. The residue was dissolved with 250 µl MeOH and diluted 1/10 with MeOH before the HPLC analysis.

2.6. Analysis equipment

Chromatography was conducted with an Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC (RRLC) system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a diode-array detector (DAD). Analysis of the solutions after being loaded, washed and eluted from the MISPE cartridge were performed on a Zorbax Eclipse Plus-C₁₈ column (4.6×150 mm, 1.8 µm particle size) maintained at room temperature. The injection volume of samples was 10 µl and the chromatograms were recorded at 280 nm. The mobile phase, consisting of deionised water with 0.05 % AAC (A) and MeCN (B), was pumped at 0.8 ml min⁻¹ into the HPLC system with the following gradient elution program: 0–5 min, 5–13% B; 5–11 min, 13–19% B; 11–15 min, 19–95% B. Subsequently, the B content was decreased to the initial conditions and for 5.5 min the column was re-equilibrated (total run time 22 min).

2.7. Calculation of Hansen's solubility parameters

To predict the solvating ability of a solvent for a given molecule that has polar and hydrogen bonding functional groups, Hansen [29] proposed an extension of the Hildebrand solubility parameter [30], considering the contribution from dispersive δ_d , dipolar δ_p and hydrogen bonding δ_h interactions. The total solubility parameter δ_t can be divided into three components, the so-called Hansen solubility parameters (HSP), corresponding to the mentioned different types of molecular interactions:

$$\delta_t^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (6)$$

This parameter has been previously used in SPE to describe the relationships between analyte and solvent; analyte and sorbent; and solvent and sorbent [31].

The calculation of the HSP is a developed incremental method [32,33] based on group attraction constants F_{Di} and F_{Pi} , for dispersion and polar components, and group cohesion energies E_{Hi} .

$$\delta_d = \frac{\sum_{i=1}^n F_{Di}}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad (7)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n F_{Pi}^2}}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad (8)$$

$$\delta_h = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n E_{Hi}}}{\sum_{i=1}^n V_i} \quad (9)$$

where V_i represents the molar volume of each group.

For a solvent mixture where all components have similar molar volume, the corresponding HSP are related to the volume fraction ϕ_i and individual solubility parameter δ_i of the components by the expression:

$$\bar{\delta} = \sum_{i=1}^n \phi_i \delta_i \quad (10)$$

A useful concept is the solubility parameter distance, R_0 . Using the three dimensional diagram with δ_d , δ_p , δ_h as coordinates, a given solvent and analyte are represented as two points, and the distance between the two points (R_0) is used to characterise the analyte-solvent affinity,

$$R_0 = [4(\delta_{1d}-\delta_{2d})^2 + (\delta_{1p}-\delta_{2p})^2 + (\delta_{1h}-\delta_{2h})^2]^{1/2} \quad (11)$$

where δ_{1i} and δ_{2i} represent the coordinates of the analyte and the solvent, respectively. This means that the analyte-solvent interactions increase when the R_0 decreases.

3. Results and discussion

3.1. Binding properties characterisation

FI is the most easily applied continuous distribution model and this isotherm perfectly models the binding of the target analyte onto a MIP [34] so the binding properties of both MIP and NIP were calculated by modelling the experimental binding data with the log format of the FI (eq. (2)). **Fig. 2** shows the HTY adsorption isotherms for MIP and NIP in pure MeCN and MeCN/chloroform (1:3, v/v) and their corresponding experimental FI in log format. As can be seen, good linear correlation coefficients have

been obtained (R^2 values higher than 0.99 in all the cases) demonstrating that FI fits perfectly the experimental data. **Table 1** summarises all the fitting parameters (a , m and R^2) and the values of $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ and $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ calculated from eq. (4) and (5).

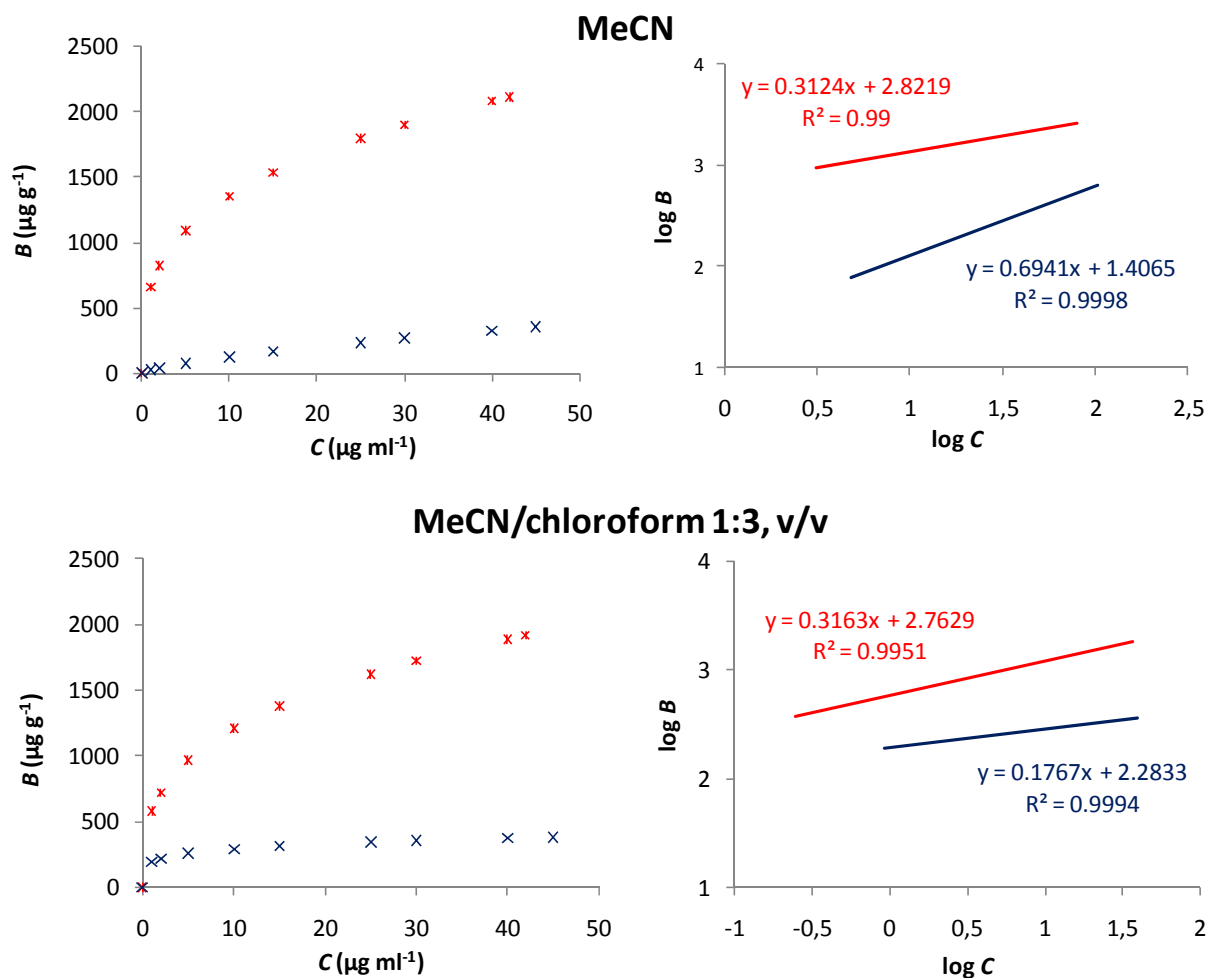


Figure 2. HTY adsorption isotherms for MIP (*) and NIP (x) in MeCN and MeCN/chloroform (1:3, v/v) and their corresponding experimental Freundlich isotherm in log format. Binding conditions: quantity of MIP or NIP, 8 mg; solution volume, 4 ml; binding time, 24 h

It is well known that MIPs have a heterogeneous distribution of binding sites. It has been proposed that a broad unimodal distribution is most consistent with the observed binding properties and with the many sources of heterogeneity in MIPs [34]. These distributions are commonly represented as ADs, which plots the number of sites (N) that have association constant (K) (**Fig. 3**).

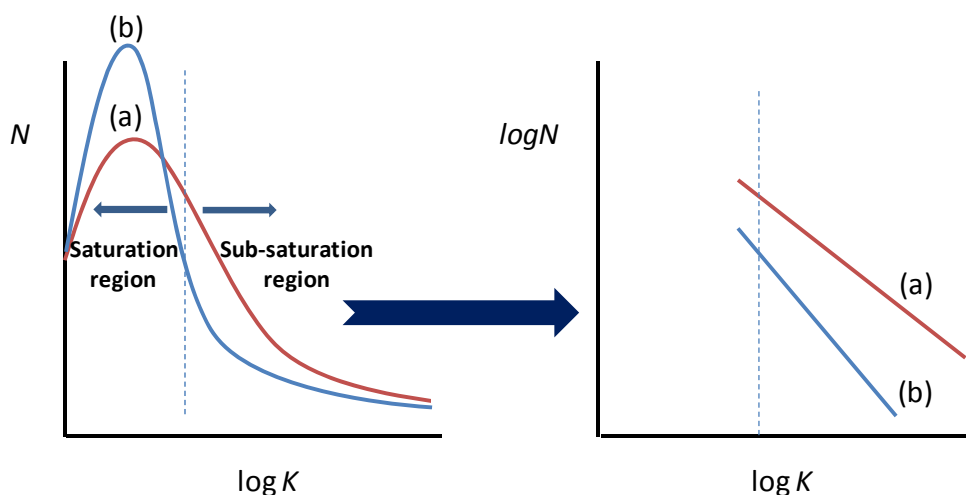


Figure 3. Depiction of the typical affinity distribution for a MIP **(a)** and NIP **(b)** in N vs. $\log K$ and $\log N$ vs. $\log K$ formats

The distribution has two characteristic regions: the unimodal peak at low affinity and the asymptotically decaying high-affinity region. Most MIPs are used and tested in the concentration window corresponding to the asymptotically decaying portion of the distribution and this part is perfectly modelled by using FI.

The exponentially decaying distribution based on the Freundlich parameters (eq. (3)) generates a straight line on the graph presented in $\log N$ vs. $\log K$ format (**Fig. 3**). Therefore, visual inspection on vertical positions and slopes of the ADs can be made more easily in $\log N$ vs. $\log K$ format in order to compare quality of binding sites among affinity distributions generated by different MIPs.

Fig. 4 shows the generated ADs in $\log N$ vs. $\log K$ format for MIP and NIP in pure MeCN and MeCN/chloroform (1:3, v/v). The most visible difference between the respective ADs is the bigger capacity of the MIP within the measured concentration window. This can be seen in the higher positioning of the MIP curves in both cases, which leads to confirm the imprinting effect.

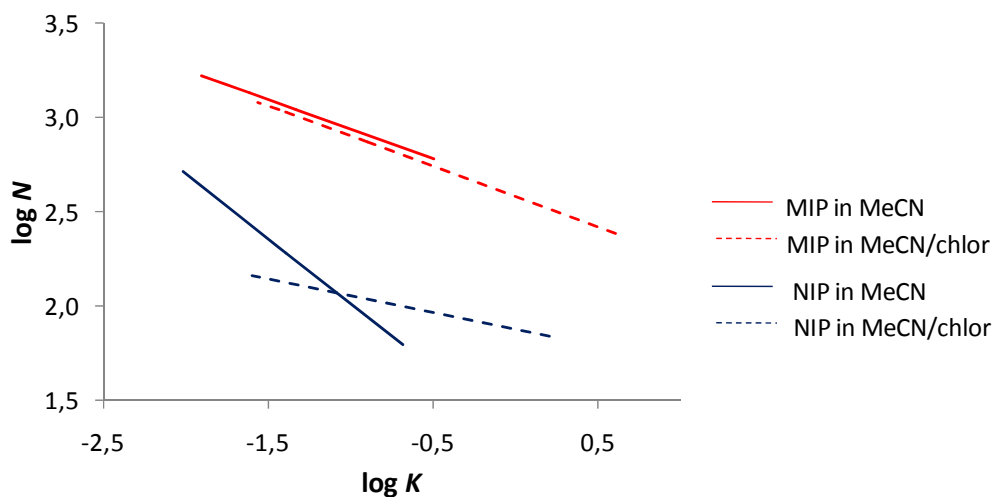


Figure 4. Affinity distributions for HTY binding to MIP and NIP in MeCN and MeCN/ chloroform (1:3, v/v) calculated using the affinity distribution function (Eq. (3)) in terms of $\log N$ vs. $\log K$

This qualitative assessment was confirmed by calculation of the respective $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ and $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ values (**Table 1**). In pure MeCN, the values of $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ were 1477.2 and 288.9 mmol g^{-1} , for MIP and NIP, respectively, and 1306.1 and 184.7 mmol g^{-1} , for MIP and NIP, correspondingly, in the solvent mixture MeCN/chloroform. In addition, the $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ values helped to corroborate the imprinting phenomenon since they were higher for MIP than for NIP (0.07 and 0.04 l mmol^{-1} in MeCN for MIP and NIP, respectively; 0.47 and 0.31 l mmol^{-1} in the mixture MeCN/chloroform, for MIP and NIP, respectively). Summarising, the MIP has a larger population off high-affinity binding sites in the window of concentration tested, revealing the imprinting effect.

Table 1. Freundlich fitting parameters, number of sites and weighted average affinity for HTY binding on MIP and NIP in MeCN and MeCN/chloroform (1/3, v/v)

Polymer [solvent]	<i>m</i>	<i>a</i> (l^{<i>m</i>} mmol^{1-<i>m</i>}) g⁻¹	<i>R</i>²	<i>N</i>_{<i>K</i>_{min}-<i>K</i>_{max}} (mmol g⁻¹)*	<i>K</i>_{<i>K</i>_{min}-<i>K</i>_{max}} (l mmol⁻¹)*
MIP [MeCN]	0.31	663.59	0.9925	1477.21	0.07
NIP [MeCN]	0.69	25.50	0.9998	288.90	0.04
MIP [MeCN/chlor]	0.32	579.30	0.9951	1306.05	0.47
NIP [MeCN/chlor]	0.18	192.02	0.9994	184.74	0.31

* $N_{K_{min}-K_{max}}$ and $K_{K_{min}-K_{max}}$ calculated in the range $\log(K) = -2 - 0.5$

Regarding the nature of the solvent, it is well known that high binding strengths between the substrate and the MIPs are obtained with low polarity solvents. This is because the substrate interacts with the non-covalently MIP primarily by ionic or hydrogen-bonding [34]. Therefore, modifying the polarity of the medium will affect the nature and strength of these interactions. On the one hand, decreasing the polarity of the solvent to obtain higher binding strength can increase the contribution of the non-specific interactions with the polymers and, on the other hand, an increase in the polarity can make the substrate more solubilised by the solvent (increasing the interactions solvent-substrate) and thence, less able to interact with the polymers (bearing in mind that HTY is more soluble in polar solvents than in non-polar).

Fig. 4 clearly shows the effect in the polymers behaviour by modifying the polarity of the solvent. Both ADs for MIP and NIP underwent a displacement towards the region of the high-affinity binding sites when the experiments were carried out in the mixture MeCN/chloroform. In contrast, when pure MeCN was used as the solvent, the ADs lines were located to the left, in the region where the ratio low-affinity to high-affinity binding sites starts to increase, that is, in the saturation region. This visual fact can be quantitatively confirmed with the variation of $N_{K_{min}-K_{max}}$ and $K_{K_{min}-K_{max}}$. In pure MeCN, $N_{K_{min}-K_{max}}$ for the MIP was 1477.2 mmol g⁻¹ while in MeCN/chloroform was 1306.5 mmol g⁻¹. Regarding $K_{K_{min}-K_{max}}$, values change from 0.07 to 0.47 l mmol⁻¹ in MeCN and

MeCN/chloroform, respectively. Similar variations were observed for the NIP. When the rebinding of HTY takes place in a moderate polar solvent as MeCN, substrate-solvent interactions are relatively high, leading to a decrease in the number of high-affinity binding sites that are accessible. In contrast, if the experiments are made with a less polar solvent, such as the mixture MeCN/chloroform (1:3, v/v), the possible interactions between the substrate and the polymer increase and thence, high-affinity binding sites are preferably sampled. All of this can be corroborated with the fact that, while values of $N_{K_{\min}-K_{\max}}$ barely change (less than 13%), values of $K_{K_{\min}-K_{\max}}$ are 650 % greater in MeCN/chloroform than in pure MeCN. These results highlight the existence of a great imprinting effect that is increased in the presence of low polar mixture of solvents. The influence of the polarity of different solvents and mixture of solvents in the analyte-solvent-sorbent interactions is further discussed in *section 3.3* by employing HSP.

3.2. Evaluation of the MIP as sorbent in SPE

To evaluate the capacity and selectivity of the polymer, HTY, together with a mixture of eight structurally related compounds, CAT, TY, DOPAC, HPPAC, DPPAC, CAF, COUM and CIN (**Fig. 1**), were analysed. From those compounds, TY bears the best structural resemblance, as it only lacks an hydroxyl-group from the HTY structure. Nonetheless, all the compounds bear multiple hydroxyl groups and most bear a carboxyl group, hence being prone to form hydrogen bonds with the polymer matrix. As a result, strong competition for both specific and non-specific binding sites is expected in the MIP.

The same procedures were performed on both MIP and NIP and all the solutions collected during the process, sample loading (containing the non-adsorbed compounds), washing and elution steps, were analysed. Results are presented on **Tables 2-5**, which show the amount of each compound detected in all the collected aliquots from the different MISPE steps in both imprinted and non-imprinted polymers. The amounts of analytes detected have been expressed as μg per μg of

compound loaded onto the cartridge and g of polymer, and as percentage of compound recovered in each of the aliquots.

Table 2. Amount of phenolic compounds* in each of the collected fractions during the MISPE procedure using MeCN as loading and washing solvents

Compound	Not adsorbed				Washed				Retained			
	MIP		NIP		MIP		NIP		MIP		NIP	
	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%
HTY	0.11	1.06	1.28	12.76	1.05	10.51	4.06	40.64	8.50	84.99	3.75	37.45
DOPAC	-	-	-	-	-	-	-	-	8.82	88.16	9.04	90.37
TY	2.53	25.34	3.85	38.47	3.99	39.89	3.72	37.22	2.22	22.25	1.63	16.28
CAT	0.15	1.48	1.25	12.48	1.30	12.96	1.53	15.32	5.24	52.41	2.63	26.34
DPPAC	-	-	-	-	0.09	0.85	0.10	0.96	9.33	93.32	9.38	93.82
CAF	-	-	0.17	1.66	-	-	-	-	7.02	70.24	7.15	71.49
HPPAC	-	-	0.13	1.31	0.45	4.46	1.90	19.00	9.37	93.66	7.76	77.63
COUM	0.08	0.83	0.09	0.89	0.10	0.96	0.30	3.01	9.16	91.59	8.87	88.73
CIN	0.18	1.83	0.36	3.58	2.28	22.78	3.17	31.71	6.30	63.00	5.19	51.85

*A mixture of 0.05 mM of each analyte was loaded onto the cartridge. The amount of compound detected on each of the aliquots collected during the MISPE has been expressed in two ways, (µg) µg of compound per µg of compound loaded onto the cartridge and per g of polymer and (%) percentage of compound recovered

Table 3. Amount of phenolic compounds* in each of the collected fractions during the MISPE procedure using MeCN/chloroform 1:3 (v/v) as loading and washing solvents.

Compound	Not adsorbed				Washed				Retained			
	MIP		NIP		MIP		NIP		MIP		NIP	
	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%
HTY	-	-	-	-	2.21	22.14	6.00	60.04	8.13	81.28	3.39	33.94
DOPAC	-	-	-	-	0.11	1.11	0.10	0.96	9.86	98.60	8.86	88.57
TY	0.81	8.14	1.00	9.99	8.82	88.16	8.40	84.00	0.37	3.67	0.36	3.56
CAT	0.11	1.12	0.13	1.33	1.04	10.41	2.05	20.51	3.38	33.82	1.94	19.38
DPPAC	-	-	-	-	-	-	0.12	1.21	10.19	101.86	9.28	92.81
CAF	-	-	-	-	-	-	0.17	1.65	6.80	68.03	6.26	62.56
HPPAC	-	-	-	-	1.33	13.25	2.86	28.62	9.31	93.08	6.78	67.77
COUM	-	-	-	-	0.19	1.86	0.61	6.07	9.25	92.46	7.69	76.94
CIN	0.15	1.53	0.25	2.51	8.15	81.54	8.26	82.60	1.10	10.97	0.66	6.61

* See table 2

Table 4. Amount of phenolic compounds* in each of the collected fractions during the MISPE procedure using MeCN/toluene 1:3 (v/v) as loading and washing solvents

Compound	Not adsorbed				Washed				Retained			
	MIP		NIP		MIP		NIP		MIP		NIP	
	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%
HTY	-	-	0.10	1.03	0.09	0.86	0.64	6.39	9.96	99.60	11.33	113.33
DOPAC	-	-	-	-	-	-	-	-	9.34	93.41	11.22	112.16
TY	0.58	5.84	3.16	31.58	4.55	45.52	7.19	71.91	4.26	42.60	0.79	7.94
CAT	-	-	0.18	1.83	0.16	1.57	2.16	21.56	6.75	67.54	3.36	33.56
DPPAC	-	-	-	-	-	-	-	-	9.59	95.85	11.69	116.95
CAF	0.16	1.62	0.17	1.65	0.16	1.62	0.16	1.62	6.71	67.12	9.85	98.51
HPPAC	-	-	-	-	-	-	0.08	0.77	10.08	100.80	12.07	120.70
COUM	0.09	0.85	0.09	0.91	0.09	0.88	0.09	0.88	8.92	89.21	11.29	112.95
CIN	0.11	1.05	0.62	6.20	1.26	12.61	6.74	67.36	7.49	74.88	3.55	35.49

* See table 2

Table 5. Amount of phenolic compounds* in each of the collected fractions during the MISPE procedure using MeCN/dioxane 1:3 (v/v) as loading and washing solvents

Compound	Not adsorbed				Washed				Retained			
	MIP		NIP		MIP		NIP		MIP		NIP	
	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%
HTY	4.09	40.89	5.83	58.27	4.74	47.42	3.41	34.12	0.78	7.81	0.49	4.88
DOPAC	1.99	19.92	4.43	44.29	5.32	53.19	4.15	41.54	1.54	15.40	0.12	1.20
TY	5.10	51.03	5.99	59.93	4.22	42.20	3.26	32.59	0.48	4.81	0.50	5.02
CAT	4.44	44.43	6.17	61.68	3.21	32.09	2.36	23.61	0.56	5.64	0.50	5.02
DPPAC	2.98	29.79	4.98	49.75	5.23	52.27	3.89	38.93	1.02	10.25	0.53	5.33
CAF	1.69	16.88	3.73	37.28	4.34	43.37	3.51	35.08	1.04	10.38	0.49	4.88
HPPAC	4.28	42.76	5.55	55.47	5.02	50.22	3.80	38.05	0.83	8.31	0.71	7.14
COUM	3.42	34.17	4.83	48.29	4.95	49.53	3.85	38.46	0.97	9.74	0.79	7.95
CIN	4.47	44.66	5.57	55.65	4.63	46.26	3.53	35.29	0.65	6.54	0.62	6.21

* See table 2

First, the cartridge was pre-equilibrated with 5 ml MeOH and with 5 ml of the same solvent used for the sample loading. 1 ml of a mixture of the compounds in a concentration of 0.05 mM was loaded onto the cartridge, and the target analyte and its structurally similar compounds were adsorbed onto the stationary phase. MeCN and mixtures of MeCN with less polar solvents (MeCN/chloroform (1:3, v/v), MeCN/toluene (1:3, v/v) and MeCN/dioxane (1:3, v/v)) were tested for sample loading, in order to favour the interactions template-monomer. According to literature (and as

was observed in the batch rebinding studies, *section 3.1*), the rebinding of the template in polymers employing hydrogen bonding and other polar forces, takes place using the same solvent as during polymerisation and thus analyte retention increases when the polarity of the solvent used decreases [10]. The use of mixtures with MeCN instead of using the pure solvents was done considering the solubility of the studied phenolic compounds.

All the amount of HTY passed through the MISPE cartridge was retained when using the mixture of solvents MeCN/chloroform and MeCN/toluene. Other compounds (TY and CIN), however, could be detected in all the load solutions. As it can be seen in **Table 5**, using MeCN/dioxane there was breakthrough of all the compounds from NIP and MIP loading the same amount of sample, in spite of the lower polarity of the mixture; for instance, more than 40% and 58% of the amount of HTY loaded was not retained onto the MIP and NIP cartridges, respectively. This behaviour will be discussed and correlated with the solubility parameters of the molecules and solvents in *section 3.3*.

We studied the effects of the sample load volume using the mixture MeCN/chloroform, which was the one allowing the biggest adsorption of compounds onto the polymer. The load volume was increased from 1 to 3 ml; the amount of all the analytes detected in the load solution collected after passing through the MISPE cartridge, including HTY, increased when the second ml was added. Therefore, 1 ml was maintained as loading volume.

The solid phase was then washed with 1 ml of the same solvent used for the sample loading. More than 10 and 20% of HTY was washed out from the MIP when using MeCN and MeCN/chloroform, respectively, but at the same time, substantial amounts of TY, CAT, HPPAC and CIN could be washed out from the MIP as well. Only a small amount of HTY was washed out by the application of 1 ml of MeCN/toluene on the MIP (less than 1%), but also less amounts of the structurally related compounds were released (compared to the ones washed out when using pure MeCN). The washing with MeCN/dioxane released big amounts of all the compounds (between 32-53% and 23-42% of the amount retained during the loading step onto the MIP and NIP,

respectively). As a result, MeCN/dioxane is not a suitable solvent for the sample loading or the washing step.

The bound analytes were recovered in the elution step. Polar protic solvents, also including weak acids, are able to disrupt the interactions based on hydrogen bonding so that the analytes are released from the polymer [10]. For this reason, both MeOH and MeOH/AAC (9:1, v/v), which is the most common elution solvent for MISPE of phenolic compounds [15,16,17], were tested. The influence of solvent volumes on the release of compounds was under study and was increased until no release of all the phenolic compounds was detected. 5 ml of MeOH/AAC (9:1, v/v) was finally selected as elution solvent, since increasing the volume did not enable higher recoveries, and almost double volume was needed to obtain the same results using pure MeOH.

The recoveries (%) and specific binding capacities were then calculated in order to evaluate the cartridge capacity for each of the selected phenolic compounds and the results are shown in **Fig. 5** and **6**, respectively. The specific binding capacity was calculated by the deduction of the amount non-specifically adsorbed on the NIP from the amount adsorbed on the MIP (μg per μg of compound loaded and g of polymer). In view of the recoveries (**Fig. 5**), all the phenolic compounds examined in this work were able to interact with the polymeric matrix. Since the NIP was synthesised without template, it does not possess recognition sites complementary to the spatial structure of any compound and thus, the interactions are non-specific and mainly on the surface of the polymer, e.g. ionic and hydrogen bonding interactions between the hydroxyl and carboxyl groups and the basic VP monomer.

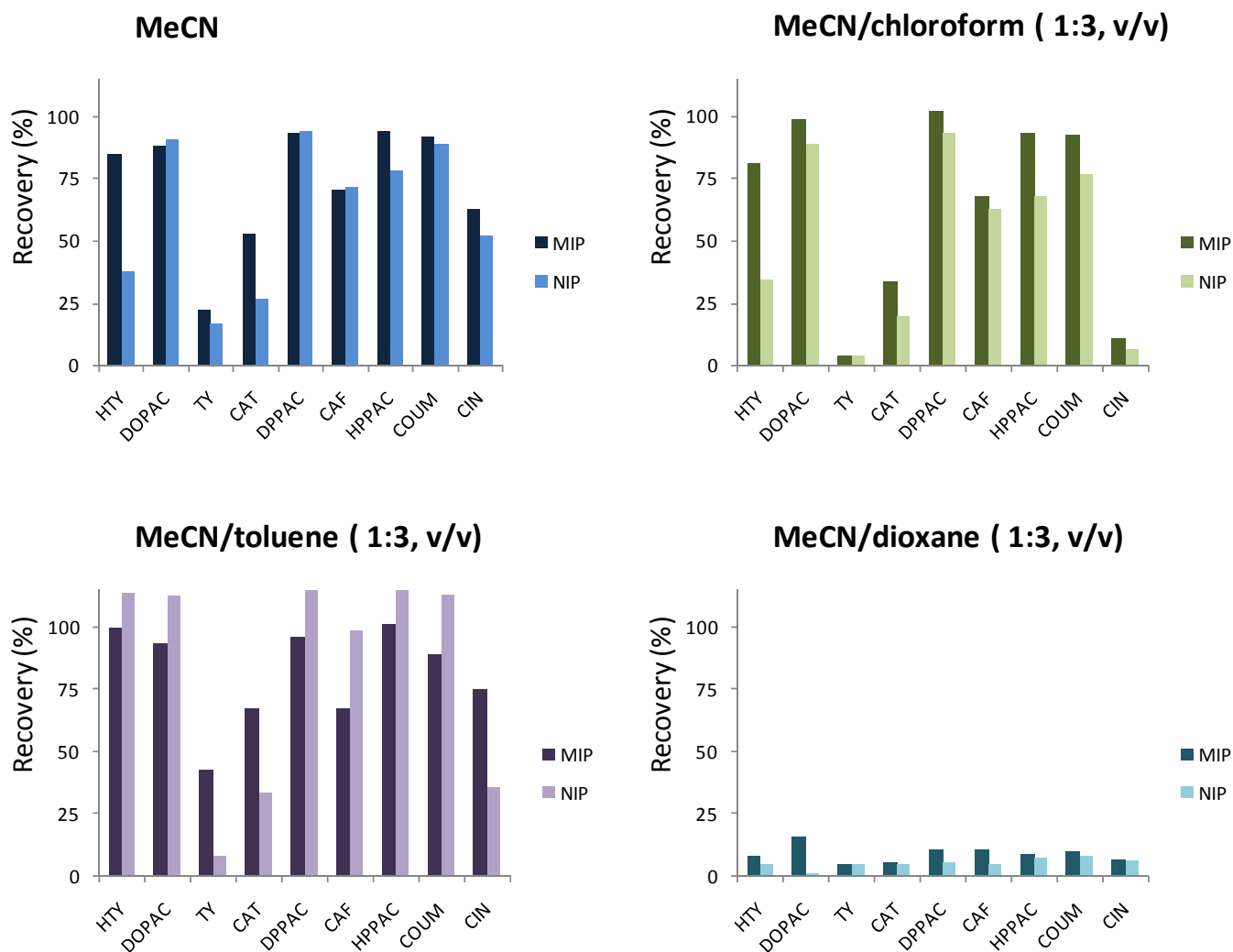


Figure 5. SPE recoveries (%) of selected analytes on MIP and NIP using different loading and washing solvents

The lowest recoveries (around 5-10%) of all the compounds in both MIP and NIP were observed using MeCN/dioxane. As will be explain in *section 3.3.*, due to the strong interactions between solvent and phenolic compounds, the analytes were both poorly adsorbed onto the polymeric matrix, and subsequently washed out from it. The use of this solvent did not demonstrate the binding capacity of the polymer towards the template.

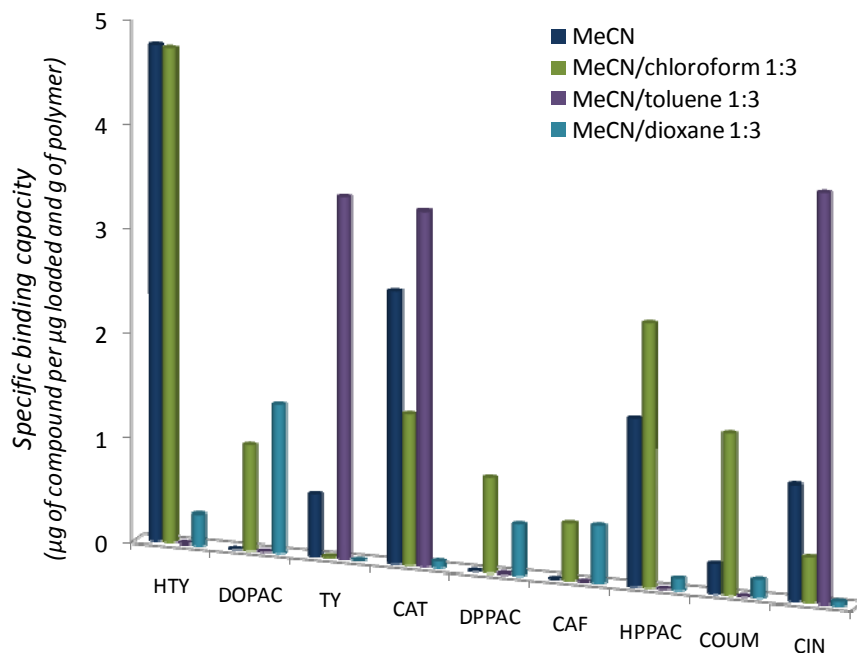


Figure 6. Specific binding (μg per μg of compound loaded and g of polymer) using different loading and washing solvents

MeCN was used as the porogen during the synthesis of the polymer and, as expected, high recovery and the best specific binding capacity of the template on the MIP was achieved with this solvent (85% and $4.75 \mu\text{g}$ of HTY per μg loaded and g of MIP, respectively). The ability of MeCN to compete for the hydrogen-bonding sites in the polymer matrix is limited. The big difference found in the HTY recoveries for MIP and NIP, represented in the high specific binding capacity value, and not obtained for the other compounds, reveals the imprinting effect and the presence of high-affinity binding sites for HTY in the MIP, as it was demonstrated in *section 3.1*). The value of specific binding capacity of CAT was high as well ($2.61 \mu\text{g}$ of CAT per μg loaded and g of MIP), although its recovery was lower (22.3%). CAT is smaller than HTY (has no acrylic group) and might easily enter the MIP's cavities induced by HTY, where its two hydroxyl groups can form hydrogen bonds with the amino groups of the polymer. Nevertheless, its smaller size matches poorly the cavities, resulting in weaker binding interaction and lower retention. It is also noticeable that the specific binding capacity of MIP for TY is very low in spite of its resemblance with the template.

MeCN/chloroform provided similar recovery and specific binding capacity values to the ones obtained for HTY with MeCN although the recovery ratio MIP/NIP is slightly

higher in MeCN/chloroform than in pure MeCN (240 and 220%, respectively). This is consistent with the results generated in the affinity distribution analysis. Some differences, however, were found in the recovery of TY, CAT and CIN, which were noticeably higher when MeCN was the loading and washing solvent. HPPAC and COUM presented relatively high specific binding capacities (2.55 and 1.55 μg per μg of compound loaded and g of polymer, respectively) using MeCN/chloroform as loading solvent. Both compounds are very similar to HTY in size and shape but the absence of the hydroxyl group in position 3 in the benzene reduces their ability to form hydrogen bonds in the MIP's cavities.

The use of MeCN/toluene lead to very different results and no specific binding capacity for HTY could be witnessed when loading the compounds with that mixture of solvents. Nonetheless, the MIP demonstrated high binding capacity for CIN, TY and CAT, with recoveries ranging from 40 to 70%, which suggest that those compounds interact poorly with the solvent and strongly with the MIP; they can be retained in the cavities of the MIP (in specific recognition sites) and some other polar interactions also participate in their binding. The rest of the studied compounds, on the contrary, showed high recoveries in both MIP and NIP with low binding capacities, due to the non-specific analyte-sorbent interactions enhanced by the low polarity of the solvent mixture.

According to these results, MeCN and MeCN/chloroform (1:3, v/v) are suitable as loading and washing solvents, while the elution can be performed with MeOH/AAC (9:1, v/v).

3.3. Interactions in the analyte-sorbent-solvent system

Hansen solubility parameters (HSP) for pure solvents were taken from the literature [35] and calculated by means of eq. (10) for the mixtures of solvents. Since the solubility parameters for phenolic compounds are not available, their values were estimated by incremental methods using eq. (6)-(9) and the corresponding group increments (dispersive F_d , polar F_p and hydrogen bonding E_h interactions), which are

tabulated in the literature [36]. Values of solubility parameters for solvents and analytes are given in **Table 6**.

Table 6. Estimation of the Hansen solubility parameters of solvents and analytes

Solvents and analytes	δ (MPa ^{1/2})	δ_d (MPa ^{1/2})	δ_p (MPa ^{1/2})	δ_h (MPa ^{1/2})
<i>MeCN</i>	24.40	15.30	18.00	6.10
<i>MeCN/chloroform 1:3 v/v</i>	19.37	17.18	6.83	5.80
<i>MeCN/toluene 1:3 v/v</i>	18.44	17.33	5.55	3.03
<i>MeCN/dioxane 1:3 v/v</i>	20.27	18.08	5.85	7.08
<i>HTY</i>	30.97	19.83	7.43	22.60
<i>DOPAC</i>	29.31	19.85	6.92	20.42
<i>TY</i>	28.38	19.72	6.66	19.29
<i>CAT</i>	30.14	20.24	7.83	20.92
<i>DPPAC</i>	28.01	19.48	6.10	19.17
<i>CAF</i>	28.11	19.38	6.24	19.38
<i>HPPAC</i>	25.31	19.36	5.26	15.43
<i>COUM</i>	25.37	19.25	5.38	15.61
<i>CIN</i>	21.63	19.10	3.84	9.40

The HSP are physicochemical parameters that enable the estimation of the type of inter-molecular interaction forces (dispersion, polar and/or hydrogen bonding), and thus provide information about the capacity of a given solvent or mixture of solvents to dissolve a substrate. The polar solvents have higher levels of δ_p whilst the protic have higher levels of δ_h , e.g. considering the solvents used in this study, pure MeCN is much more polar than any of its mixtures but slightly less hydrogen bonding than MeCN/dioxane (1:3, v/v). The latter mixture, however, will provide the highest dispersive interactions with the analytes.

To explain loading and washing solvent effects on the retention by the MIP and NIP, the solubility parameter distance (R_0) between all the solvents used and the analytes were investigated. The R_0 values, calculated by means of eq. (11) for each pair analyte-solvent, are given in **Table 7**. Without taking into account the analyte-sorbent interactions, the bigger this parameter, the smaller the analyte-solvent interactions, and thus, the higher the recoveries would be.

Table 7. Solubility parameter distance (R_0) for each pair analyte-solvent

	$[4(\delta_{1d}-\delta_{2d})^2]^{1/2}$	$[(\delta_{1p}-\delta_{2p})^2]^{1/2}$	$[(\delta_{1h}-\delta_{2h})^2]^{1/2}$	$R_0, \text{MPa}^{1/2}$
MeCN				
<i>HTY</i>	9.06	10.57	16.50	21.59
<i>DOPAC</i>	9.10	11.08	14.32	20.26
<i>TY</i>	8.84	11.34	13.19	19.51
<i>CAT</i>	9.88	10.17	14.82	20.51
<i>DPPAC</i>	8.37	11.90	13.07	19.56
<i>CAF</i>	8.17	11.76	13.28	19.54
<i>HPPAC</i>	8.13	12.74	9.33	17.76
<i>COUM</i>	7.91	12.62	9.51	17.67
<i>CIN</i>	7.60	14.16	3.30	16.41
MeCN/chloroform 1:3, v/v				
<i>HTY</i>	5.31	0.60	16.80	17.63
<i>DOPAC</i>	5.35	0.10	14.62	15.57
<i>TY</i>	5.09	0.17	13.49	14.42
<i>CAT</i>	6.13	1.00	15.12	16.35
<i>DPPAC</i>	4.62	0.72	13.37	14.17
<i>CAF</i>	4.42	0.59	13.58	14.30
<i>HPPAC</i>	4.38	1.57	9.63	10.70
<i>COUM</i>	4.16	1.44	9.81	10.76
<i>CIN</i>	3.85	2.99	3.60	6.06
MeCN/toluene 1:3, v/v				
<i>HTY</i>	5.01	1.88	19.57	20.29
<i>DOPAC</i>	5.05	1.37	17.40	18.17
<i>TY</i>	4.79	1.11	16.26	16.99
<i>CAT</i>	5.83	2.28	17.89	18.96
<i>DPPAC</i>	4.32	0.55	16.15	16.73
<i>CAF</i>	4.12	0.69	16.36	16.88
<i>HPPAC</i>	4.08	0.29	12.41	13.06
<i>COUM</i>	3.86	0.17	12.59	13.17
<i>CIN</i>	3.55	1.71	6.38	7.50
MeCN/dioxane 1:3, v/v				
<i>HTY</i>	3.51	1.58	15.52	15.99
<i>DOPAC</i>	3.55	1.07	13.35	13.85
<i>TY</i>	3.29	0.81	12.21	12.68
<i>CAT</i>	4.33	1.98	13.84	14.64
<i>DPPAC</i>	2.82	0.25	12.10	12.43
<i>CAF</i>	2.62	0.39	12.31	12.59
<i>HPPAC</i>	2.58	0.59	8.36	8.76
<i>COUM</i>	2.36	0.47	8.54	8.87
<i>CIN</i>	2.05	2.01	2.33	3.70

The mixture MeCN/dioxane (1:3, v/v), in spite of its lower polarity, is able to strongly interact by means of dispersive forces with the analytes, as can be seen in the corresponding R_0 values, which are the smallest amongst the considered pair analyte-solvent. In this way, using MeCN/dioxane the analytes were not adsorbed onto the MIP during the loading step and were mostly washed out as well, so that the elution recoveries (%) were the smallest.

To explain the specific binding capacity of the MIP, a comparison of the recovery versus R_0 is shown in **Fig. 7**. When MeCN is used as loading and washing solvent in the NIP, the analytes grouped according to their interactions with the solvent and the polymer. The first group (CAT, TY and HTY) bear two hydroxyl groups in their structure, being able to form hydrogen bonds with the polymer matrix. They follow the general premise of the smaller the R_0 , the lower the recovery (i.e. the interactions solvent-analyte are stronger and the sorbent retains less amount of analyte). CAF, COUM, DOPAC, DPPAC and HPPAC, which constitute the second group of compounds, in addition to the hydroxyl groups, bear in their structures a carboxyl group. This acid group bonds the basic VP monomer by means of ionic interactions, which are stronger than the hydrogen ones, leading to a bigger retention of those compounds in the polymeric matrix. CIN stands alone in the third group; it is a phenolic acid without hydroxyl groups, thereby it is less bonded to the NIP than the other phenolic acids, but more than CAT, TY and HTY. Using MeCN/chloroform (1:3, v/v), the arrangement of the analytes in the graph is very similar except for CIN, whose R_0 value is the lowest, and so it interacts more strongly with the solvent, diminishing its ionic interactions with the sorbent and obtaining a lower recovery.

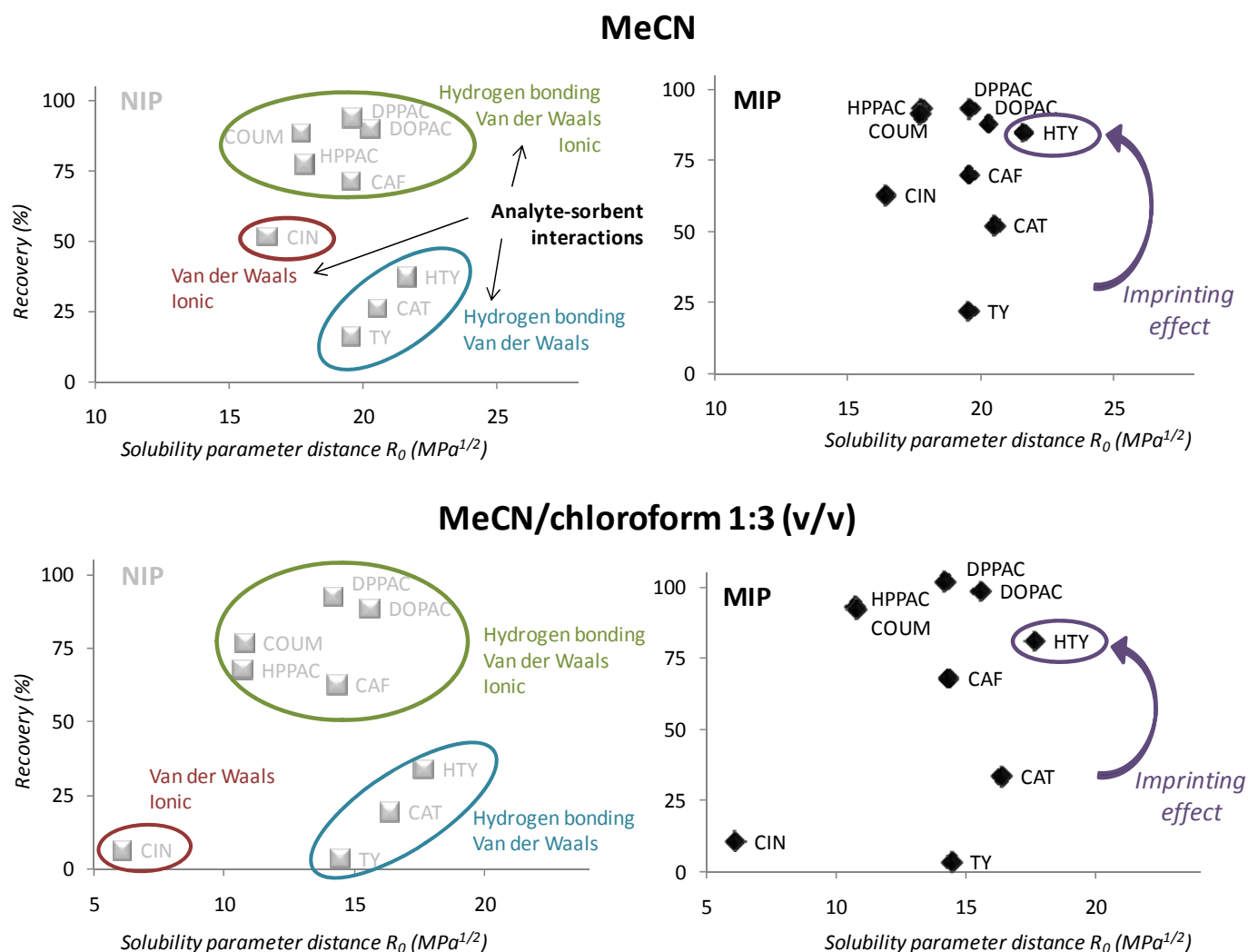


Figure 7. Comparison of the recovery (%) versus the solubility parameter distance R_0 using MeCN and MeCN/chloroform (1:3, v/v) as sample loading and washing solvents. The interactions involved in the retention of the different analytes and the imprinting effect are outlined

In the MIP, the arrangement of the compounds into three groups is not as clear, especially for MeCN, although it can be still discerned. The recoveries for the group of hydroxyphenolic acids are similar to the ones obtained with the NIP; for the other two groups of compounds, the recoveries are slightly bigger than in the NIP, except for HTY, in which the increment is very noticeable. The difference between both polymers is that the MIP was synthesised with template and thus possesses recognition sites complementary to the spatial structure of HTY. This leads to the deduction that highly specific binding sites have been created in the MIP and hence, successful imprinting of HTY could be confirmed with substantial evidence.

3.4. Analysis of VOO

Apart from the theoretical considerations, and according to the obtained results, the synthesised MIP seems to be able to retain selectively HTY with high enough capacity and affinity. Thus, a preliminary evaluation on the use of this polymer in MISPE of HTY in a real sample (VOO) was carried out.

A previously optimised method for the extraction of phenolic compounds from olive oil (see *section 2.5.*) was used and the capacities of the commercial SPE sorbent (Diol) and MIP were compared. Both HTY and TY could be detected in the VOO and their calibration curves were established: $y=2499.2x-7.7847$ ($R^2=0.9964$) and $y=1538.1x-4.9021$ ($R^2=0.9966$), respectively. In this way, Diol-SPE could extract 6.46 mg HTY kg^{-1} VOO and 8.33 mg TY kg^{-1} VOO; the MIP allowed the extraction of bigger amounts of compounds, 7.50 mg HTY kg^{-1} VOO and 11.73 mg TY kg^{-1} VOO.

All the experiments carried out during the evaluation of the MIP and the VOO sample extraction have been performed using the same cartridge without loss of binding capacity. The Diol sorbent, however, lost most of its activity after one application.

The disadvantage of this MISPE procedure was the little selectivity it provided, extracting the same number of compounds as the Diol-SPE. Since the sorbent washing was done with hexane, all polar compounds were retained in both Diol and MIP cartridges. Nonetheless, and in spite of the non-selective conditions, the MIP could achieve higher recoveries of the template HTY and its related compound, TY.

This preliminary evaluation is very promising and thus HTY-MIP is under further evaluation in our laboratory for the development of selective MISPE methods for the determination of HTY from VOO.

4. Concluding remarks

In the present work, the non-covalent molecular imprinting technique was successfully used for the preparation of a polymer with high affinity binding sites for the template, HTY. The binding properties of the MIP and NIP were first evaluated via batch

rebinding experiments. The experimental adsorption isotherms obtained in solvents with different polarities (MeCN and MeCN/chloroform 1:3, v/v) were fitted by using the Freundlich model and then, the number of binding sites and the weighted average affinity were calculated via affinity distribution analysis. The imprinting effect was demonstrated since both the number of binding sites and the weighted average affinities were higher in MIP than in MIP in all the rebinding experiments. Changes in the composition of the solvents, from more polar (pure MeCN) to less polar (MeCN/chloroform 1:3, v/v) led to an increase in the recognition ability of the MIP with a significant enhancement of the weighted average affinity. The performance of the MIP was further evaluated and the application of eight phenolic compounds structurally related to HTY revealed the potential and limitations of the MIP. The analysed phenolic compounds possess hydroxyl and/or carboxyl groups in their structures, being able to interact non-specifically with the polymer matrix. The effect of different solvents in the specific binding capacity and recoveries of all the analytes was studied during the MISPE process. Even though the MIP demonstrated good recognition ability and recovery for HTY using MeCN and MeCN/chloroform (1:3, v/v) as loading and washing solvents, it was not selective using MeCN/toluene (1:3, v/v) and did not have any retention ability using MeCN/dioxane (1:3, v/v). The solubility parameter concept was used to explain the effect of the loading and washing solvent on the adsorption of compounds onto the polymer, as well as to aid in the demonstration of the imprinting effect. According to the obtained results, highly specific binding sites for HTY have been created in the MIP and successful imprinting was confirmed. Consequently, it was used as sorbent in the extraction of the phenolic fraction of VOO and its performance was compared with a commercial Diol cartridge, enabling the extraction of higher amounts of HTY and TY. The produced MIP is a low-cost, durable (did not present loss of activity after being subjected to several extractions), and thermally and mechanically stable material which can be used effectively in the sample pretreatment of complex matrices.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Education (FPU grants references AP2006-01147, AP2005-2985 and Project CTQ2008-01394) and the Regional Government of Andalucía (Excellence projects P07-FQM-2625 and P09-CTS-4564). We gratefully acknowledge Dr. A. Carrasco-Pancorbo and A.L. Medina-Castillo (University of Granada) for their useful suggestions and discussions.

5. References

- [1] H. Yan, K.H. Row, *Int. J. Mol. Sci.* 7 (2006) 155.
- [2] S.A. Piletsky, A.P.F. Turner, *Electroanalysis* 14 (2001) 317.
- [3] E.L. Holthoff, F.V. Bright, *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 147.
- [4] A. Valero-Navarro, A. Salinas-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, R. Mallavia, A. Fernández-Gutiérrez, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2305.
- [5] E. Turiel, A. Martín-Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1876.
- [6] C. Alexander, L. Davidson, W. Hayes, *Tetrahedron* 59 (2003) 2025.
- [7] F. Lanza, B. Sellergen, *Chromatographia* 53 (2001) 599.
- [8] F.G. Tamayo, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 32.
- [9] M. Lasáková, P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 799.
- [10] A.M. Esteban, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 795.
- [11] E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G Cormack, D.C. Sherrington, *TrAC* 25 (2006) 143.
- [12] C.M. Lok, R. Son, *Int. Food Res. J.* 16 (2009) 127.
- [13] L. Ding, H. Li, F. Tang, S. Yao, *Anal. Lett.* 39 (2006) 2373.
- [14] A. Molinelli, R. Weiss, B. Mizaikoff, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1804.
- [15] G., Theodoridis, M. Lasáková, V. Skeríková, A. Tegou, N. Giantsiou, P. Jandera, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2310.
- [16] J. Xie, L. Zhu, H. Luo, L. Zhou, C. Li, X. Xu *J. Chromatogr. A* 934 (2001) 1.
- [17] G. Karasová, J. Lehotay, J. Sádecká, I. Skacáni, M. Lachová, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2468.
- [18] K.L. Tuck, P.J. Hayball, *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 636.
- [19] F. Visioli, C. Galli, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42(2002) 209.

- [20] J.G. Fernández-Bolaños, O. López, J. Fernández-Bolaños, G. Rodríguez-Gutiérrez, *Curr. Org. Chem.* 12 (2008) 442.
- [21] S. Granados-Principal, J.L. Quiles, C.L. Ramírez-Tortosa, P. Sánchez-Rovira, M.C. Ramírez-Tortosa, *Nutr. Rev.* 68 (2010) 191.
- [22] A. Bendini, L. Cerretani, A. Carrasco-Pancorbo, A.M. Gómez-Caravaca, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, J. Lercker, *Molecules* 12 (2007) 1679.
- [23] G. Rodríguez, R. Rodríguez, J. Fernández-Bolaños, R. Guillén, A. Jiménez, *Eur. Food Res. Technol.* 224 (2007) 733.
- [24] M.A. Steiakaki, G. Chatzidakis, D. Kefalopoulos, F. Ververidis, *Planta Med.* (2008) 74.
- [25] M. Jaroniec, R. Madey, *Physical Adsorption on Heterogeneous Solids*, Elsevier, New York, 1988.
- [26] R. J. Umpleby, S.C. Baxter, M. Bode, J.K. Berch, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 35.
- [27] R. J. Umpleby, S. C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4584.
- [28] A.M. Gómez-Caravaca, A. Carrasco-Pancorbo, B. Cañabate-Díaz, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Electrophoresis* 26 (2005) 3538.
- [29] C.M. Hansen, *J. Paint Technol.* 39 (1997) 104.
- [30] J.H. Hildebrand, J.M. Prausnitz, R.L. Scott, *Regular and Related Solutions*, Van Nostrand-Reinhold, New York, 1970.
- [31] K. Bielicka-Daszkiwicz, A. Voelkel, M. Pietrzyńska, K. Héberger, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5564.
- [32] A.F.M. Barton, *CRC Handbook of solubility parameters and other cohesion parameters*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1983.
- [33] A.L. Medina-Castillo, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Macromolecules* 43 (2010) 5804.
- [34] A.M. Rampey, R. J. Umpleby, G.T. Rushton, J.C. Iseman, R.N. Shah, K.D. Shimizu, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1123.
- [35] A.F.M. Barton, *Chem. Rev.* 1975, 75, 731.
- [36] J. Brandrup, E.H. Immergut, E.A. Grulke, A. Abe, D.R. Bloch, *Polymer handbook*, 4th ed., Wiley Interscience, New Jersey, 1999.

ANEXO BLOQUE I

MIPs SINTETIZADOS

1. Prior to polymerisation

1.1. Phenolic compounds used as templates

Hydroxytyrosol (HTY)

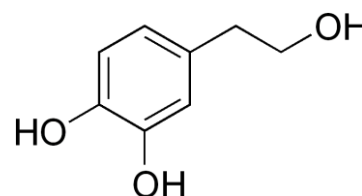
C₈H₁₀O₃, MW 154.16 g/mol

CAS: 10597-60-1

Soluble in ethanol, methanol, water (5 g/100 ml), acetonitrile

pKa 9.72 ±0.10 (most acidic)

Commercial standard purchased from TCI Europe, transparent viscous, 1 g.



Tyrosol (TY)

C₈H₁₀O₂, MW 138.164

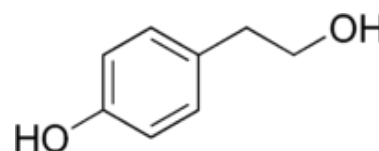
CAS: 501-94-0

Soluble in methanol, ethanol, water, acetonitrile

pKa 10.17 ±0.13 (most acidic)

Melting point 90-92°C

Commercial standard purchased from Fluka, white powder, ~0.5 g



Catechol (CAT)

C₆H₆O₂, MW 110.11 g/mol

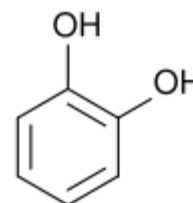
CAS: 120-80-9

Soluble in water (43 g/100 ml), acetonitrile

pKa 9.5 ±0.10 (most acidic)

Melting point 104-106°C

Commercial standard purchased from Fluka, white crystals.



3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)

$C_8H_8O_4$, MW 168.15 g/mol

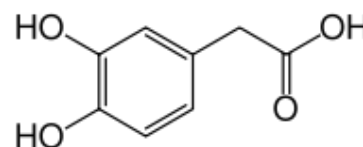
CAS: 102-32-9

Soluble in water (43 g/100 ml), acetonitrile

pKa 4.42 ± 0.10 (most acidic)

Melting point 128-130°C

Commercial standard purchased from Alfa Aesar, brown powder, 1g.

**3-(3,4-Dihydroxyphenyl)propanoic acid (DPPAC)**

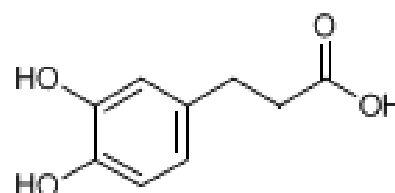
$C_9H_{10}O_3$, MW 182.18

CAS: 1078-61-1

pKa 4.75 ± 0.10 (most acidic)

Melting point 139°C

Commercial standard purchased from Alfa Aesar, brown powder, 5g.

**1.2. Chemicals**

Monomers and crosslinkers. 4-vinylpyridine (VP) was purchased from Acros Organics. It was purified by passage through a column of neutral alumina, dried over $MgSO_4$ and distilled under reduced pressure. Methacrylic acid (MAA) was purchased from Aldrich and purified by passage through a column of neutral alumina. Ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), purchased from Aldrich, and 80% divinylbenzene (DVB-80), purchased from Fluka, were passed through a column of neutral alumina and dried over $MgSO_4$. All chemicals were stored at 0°C.

Initiator. 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN) was purchased from Sigma Aldrich, purified by recrystallisation from methanol or acetone, and stored at 0°C.

Solvents. Acetonitrile (MeCN), purchased from Sigma, and toluene, purchased from Riedel-de Haën, were dried over molecular sieves for the polymerisation, and acetonitrile was filtered for chromatography. Acetone was purchased from Sigma. Water used for HPLC was doubly distilled in-house.

2. Polymerisation and work up

2.1. Monolith polymerisation

Thick-walled glass tubes (10 ml Klimax culture fitted with a screw cap and sealed with parafilm) were used for the polymerisation. The addition of chemicals was in the following order: corresponding template molecule, dry porogen (MeCN), functional monomer (VP), cross-linker (EGDMA) and finally initiator (AIBN). The solution was ultrasonicated, then purged with nitrogen gas during 10 min while cooling on an ice bath (0°C) and sealed under nitrogen. Polymerisation was carried out in an oil bath set at 60°C for 24 h.

The obtained polymer monoliths were ground mechanically, first in a mortar and then in a ball mill (Fritsch pulverisette type 06.102, Germany). The particles were separated by size through repeated wet sieving in acetone using Fisherbrand test stainless steel sieves with 25 and 38 µm aperture, and dried in vacuo overnight at 40°C. Fines were also collected. Polymers were kept at 0°C.

2.2. Precipitation polymerisation

Nalgene polypropylene bottles (125 or 60 ml) were used for the polymerisation. The addition of chemicals was in the following order: corresponding template molecule, dry porogen (MeCN), functional monomer (VP), cross-linker (DVB-80) and finally initiator (AIBN). The solution was ultrasonicated, then purged with nitrogen gas during 10 min while cooling on an ice bath (0°C) and sealed under nitrogen. The reaction vessel was then placed on Stovall rollers (rotating along the horizontal axis) in a Stuart Scientific Incubator SI60D. The temperature was increased from room temperature to 60°C over 2 h and then maintained at 60°C for further 48 h. The vessel was then removed from the incubator and allowed to return to room temperature.

At the end of the reaction, a sample of the polymerisation mixture was spotted on a glass microscope and size and shape were checked under the microscope (Carlzeiss, Jena). Polymerisation mixture was then ultrasonicated to separate possible particle aggregates. The particles were then separated from the reaction medium by vacuum filtration on a Millipore clamp with a nylon membrane filter (0.22 µm, from Sigma), washed with MeCN (100 ml) to remove unreacted chemicals and dried in vacuo overnight at 40°C. Polymers were kept at 0°C.

3. Characterisation

3.1. Column packing/washing. Chromatography

The particles with dimensions 25-38 μm size range were sedimented in acetone to remove any remaining small particles. Approximately 0.5 g of polymer was packed into 50 x 4.6 i.d. stainless steel HPLC column (Phenomenex) with a frit size of 0.2 μm using an Alltech Model 1666 Slurry Packer with acetone as the packing solvent. Afterwards, the columns were washed off-line overnight to remove template molecule and unreacted monomers with a Gilson Model 303 pump using methanol with at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} and at a pressure of 16 bar. Polymers MGR4, MGR5 and MGR7 were packed.

The chromatography was carried out using an HPLC system. The columns were connected to a Waters 1521 binary pump with Waters 717 plus autosampler and Waters 2487 dual wavelength absorbance detector. The software package used was Waters Breeze version 3.2. The UV detector was set at 254 nm (all phenolic compounds absorb at this wavelength) and 280 nm (maximum absorbance wavelength for HTY) wavelengths. Acetone was used as nonretained void marker. The injection volume was 5 μL .

Isocratic elution was carried out in the columns at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} . Several mobile phases were tested: pure MeCN; MeCN/water 94:6; MeCN/sodium acetate buffer (10 mM, pH=4) 94:6. All solvents were filtered before use. Columns were equilibrated half an hour before analysis if the mobile phase was changed and 5 min between each analysis if the same mobile phase was used.

The chromatographic evaluation was performed to the packed polymers. No good results were obtained, i.e. no imprinting effect was witnessed in the selected MIPs packed into chromatographic columns (MGR4, MGR6 and the corresponding NIP, MGR7).

3.2. Nitrogen sorption porosimetry

The BET analysis was carried out using a Micrometrics ASAP 2010 BET analyser with N_2 as the adsorbate. Sample was dried in vacuo at 40°C overnight and then 0.3-0.4 g of the polymer placed in a dry BET tube and attached to the instrument. First, vacuum is applied to remove all gas molecules and remaining moisture from the sample. The sample is then reweighed and the saturation pressure, free space and quantity of gas adsorbed by the sample were measured. Only BET analysis of MGR4 was performed.

3.3. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM imaging was carried out in the University of Strathclyde. SEM images of MGR8.1, MGR8.2, MGR10, MGR11, MGR12, MGR13 and MGR14 were acquired.

3.4. Elemental microanalysis

Microanalysis of MGR4, MGR6, MGR7, MGR10, MGR12 and MGR14 were carried out by the service in the University of Strathclyde. The C, H and N contents were determined by experiment and the O content was calculated by difference.

4. Synthesised polymers

4.1. Inventory

Table A.1. Summary of the synthesised polymers, the polymerisation conditions, the techniques used for the characterisation and the particle size after grinding for the monolith polymers

Template	Polymer name	Synthesis conditions	Characterisation
Monolith polymers, mole ratio T/M(4-Vp)/X(EDMA) 1:4:20			
CAT	MGR1	2%mol AIBN, MeCN (ml= 4/3 mass polym.)	Particle size after grinding: 25-38µm
HTY	MGR15		Particle size after grinding: < 25µm; 25-38µm
None (NIP)	MGR16	Mole ratio 0:4:20, 2%mol AIBN, MeCN (mL= 4/3 mass polym.)	Particle size after grinding: < 25µm; 25-38µm
Monolith polymers, mole ratio T/M(4-Vp)/X(EDMA) 1:8:20			
HTY	MGR4	2%mol AIBN, MeCN (ml= 4/3 mass polym.)	Particle size after grinding: fines;< 25µm; 25-38µm (packed in column); > 38 µm Microanalysis, BET
TY	MGR5		Particle size after grinding: fines; < 25µm; 25-38µm; > 38 µm
CAT	MGR6		Particle size after grinding: fines; < 25µm; 25-38µm (packed in column); > 38 µm; Microanalysis
DOPAC	MGR9		Particle size after grinding: fines; < 25µm; 25-38µm
DPPAC	MGR20		Particle size after grinding: < 25µm; 25-38µm
None (NIP)	MGR7		Mole ratio 0:8:40, 2%mol AIBN, MeCN (ml= 4/3 mass polym.)

Monolith polymers, mole ratio T/M(4-Vp)/M(MAA)/X(EDMA) 1:4:4:40			
CAT	MGR17	2%mol AIBN, MeCN (ml= 4/3 mass polym.)	Particle size after grinding: < 25µm; 25-38µm
HTY	MGR18		Particle size after grinding: < 25µm; 25-38µm
None (NIP)	MGR19	Mole ratio 0:4:4:40, 2%mol AIBN, MeCN (ml= 4/3 mass polym.)	Particle size after grinding: < 25µm; 25-38µm
Precipitation polymers, T/M(4-Vp)/X(DVB-80) 1:4:20			
CAT	MGR2.1	2% w/v M, 2% w/w AIBN, 75:25 MeCN/ Tol	Polymer did not precipitate under this conditions
None (NIP)	MGR2.2	Mole ratio 0:4:20, 2% w/v M, 2% w/w AIBN, 75:25 MeCN/ Tol	
CAT	MGR3		
	MGR8.1		SEM
	MGR12		Microanalysis, SEM
HTY	MGR10	4% w/v 4-Vp, 4% w/w AIBN, MeCN	Microanalysis, SEM
TY	MGR11		SEM
DOPAC	MGR13		SEM
DPPAC	MGR21		
None (NIP)	MGR8.2	Mole ratio 0:4:20, 4% w/v 4-Vp, 4% w/w AIBN, MeCN	SEM
	MGR14		Microanalysis SEM

Abbreviations: **VP**, 4-Vinylpyridine; **AIBN**, 2,2'-azobisisobutyronitrile; **CAT**, catechol; **DOPAC**, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; **DPPAC**, 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid; **DVB-80**, 80% divinylbenzene; **EDMA**, ethylene glycol dimethacrylate; **HTY**, hydroxytyrosol; **MAA**, methacrylic acid; **M**, monomer; **MeCN**, acetonitrile; **T**, template; **Tol**, toluene; **TY**, tyrosol; **X**, crosslinker.

4.2. Monolith polymers

4.2.1. Mole ratio template/monomer/crosslinker 1:8:20

➤ MGR1 (MIP-CAT)

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds, i.e. = 2% x (mol VP + 2 x mol EDMA) Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer, i.e. = 4/3 x 5

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0011	0.1256	
VP	105.14	0.975	4	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	20	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. 25-38 μm size range: 1.3 g; yield: 26%

➤ **MGR15 (MIP-HTy)**

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
HTY	168.15		1	0.0011	0.1758	
VP	105.14	0.975	4	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	20	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 μm size range: 1.8166 g; yield: 36.33%

25-38 μm size range 1.3701 g; yield: 27.40% (after being sedimented)

➤ **MGR16 (NIP)**

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
-			0	0	0	
VP	105.14	0.975	4	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	20	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 μm size range: 1.5239 g; yield: 30.48%

25-38 μm size range 1.6531 g; yield: 33.06% (after being sedimented)

4.2.2. Mole ratio template/monomer/crosslinker 1:8:40

➤ **MGR4 (MIP-HTY)**

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
HTY	154.16		1	0.0006	0.0879	
VP	105.14	0.975	8	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	40	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 µm size range: 1.5517 g; yield: 31.04%

25-38 µm size range 1.2889 g; yield: 25.78%

> 38 µm size range 0.3218 g

Chromatography. No evidence of imprinting.

BET analysis. Sample weight, before degas: 0.3654 g; after degas: 0.3536 g.

Area Single point surface area at P/Po 0.202: 370 m²/g

BET surface area: 385 m²/g

Langmuir surface area: 535 m²/g

BJH adsorption cumulative surface area of pores between 1.70 and 300.00 nm diameter: 297 m²/g

BJH desorption cumulative surface area of pores between 1.70 and 300.00 nm diameter: 299 m²/g

Volume Single point total pore volume of pores less than 159.0263 nm diameter at P/Po 0.988: 0.782 cm³/g

BJH adsorption cumulative pore volume of pores between 1.70 and 300.00 nm diameter: 0.756 cm³/g

BJH desorption cumulative pore volume of pores between 1.70 and 300.00 nm diameter: 0.737 cm³/g

Pore size Average pore diameter (4V/A by BET): 8.124 nm

BJH adsorption average pore diameter (4V/A): 10.185 nm

BJH desorption average pore diameter (4V/A): 9.879 nm

Microanalysis results. 61.22 %C; 6.88 %H; 1.63 %N.

➤ MGR5 (MIP-TY)

Scale: 5 g

Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
TY	138.16		1	0.0006	0.0788	
VP	105.14	0.975	8	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	40	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 µm size range: 1.5845 g; yield: 31.69%

25-38 µm size range 1.5700 g; yield: 31.4% (after being sedimented)

> 38 µm size range 0.0233

➤ **MGR6 (MIP-CAT)**

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0006	0.0628	
VP	105.14	0.975	8	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	40	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer: < 25 µm size range: 1.4019 g; yield: 28.04%

25-38 µm size range 1.3600 g; yield: 27.2% (after being sedimented); > 38 µm size range 0.0806 g

Chromatography. No evidence of imprinting.

Microanalysis results. 60.59 %C; 6.89 %H; 1.63 %N.

➤ **MGR9 (MIP-DOPAC)**

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
DOPAC	168.15		1	0.0006	0.0959	
VP	105.14	0.975	8	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	40	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer: < 25 µm size range: 1.5695 g; yield: 31.39%

25-38 µm size range 1.7137 g; yield: 34.27% (after being sedimented)

➤ **MGR10 (MIP-DPPAC)**

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
DPPAC	182.18		1	0.0006	0.1039	
VP	105.14	0.975	8	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	40	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 µm size range: 1.7997 g; yield: 35.99%

25-38 µm size range 1.8694 g; yield: 37.39% (after being sedimented)

➤ **MGR7 (NIP)**

Scale: 5 g

Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds;

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
-			0	0	0	
VP	105.14	0.975	8	0.0046	0.4795	0.4918
EDMA	198.22	1.051	40	0.0228	4.5205	4.3011
AIBN	164.21			0.0010	0.1648	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 µm size range: 1.6150 g; yield: 32.3%

25-38 µm size range 1.5874 g; yield: 31.75% (after being sedimented)

Chromatographic evaluation. Could not demonstrate the imprinting effect.

Microanalysis results. 61.65 %C; 6.70 %H; 1.71 %N.

4.2.3. Mole ratio template/monomer/monomer/crosslinker 1:4:4:40

➤ **MGR17 (MIP-HTY)**

Scale: 5 g

Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
HTY	168.15		1	0.0006	0.0887	
VP	105.14	0.975	4	0.0023	0.2419	0.2481
MAA	86.09	1.015	4	0.0023	0.1981	0.1951
EDMA	198.22	1.051	20	0.0230	4.5601	4.3388
AIBN	164.21			0.0010	0.1662	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer. < 25 µm size range: 1.5593 g; yield: 31.19%

25-38 µm size range 1.8442 g; yield: 36.88% (after being sedimented)

➤ **MGR18 (MIP-CAT)**

Scale: 5 g

Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0006	0.0633	
VP	105.14	0.975	4	0.0023	0.2419	0.2481
MAA	86.09	1.015	4	0.0023	0.1981	0.1951
EDMA	198.22	1.051	20	0.0230	4.5601	4.3388
AIBN	164.21			0.0010	0.1662	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer: < 25 µm size range: 1.3474 g; yield: 26.95%

25-38 µm size range 1.8419 g; yield: 36.84% (after being sedimented)

➤ MGR19 (NIP)

Scale: 5 g Initiator: 2 % mol of polymerisable double bonds

Solvent: MeCN, 4/3 of the mass of monomer

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
-			0	0	0	
VP	105.14	0.975	4	0.0023	0.2419	0.2481
MAA	86.09	1.015	4	0.0023	0.1981	0.1951
EDMA	198.22	1.051	20	0.0230	4.5601	4.3388
AIBN	164.21			0.0010	0.1662	
MeCN	41.05	0.786			5.2400	6.6667

Weight of the polymer: < 25 µm size range: 1.1893 g; yield: 23.79%

25-38 µm size range 1.7704 g; yield: 35.41% (after being sedimented)

4.3. Precipitation polymers (mole ratio 1:4:20)

➤ MGR2.1 (MIP-CATt)

Scale: 2 g Initiator: 2% w/w (i.e. = 2% x 2)

Solvent: total amount 2% w/v (i.e. = 2/2% = 100). MeCN/toluene 75:25

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0007	0.0728	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.04	
MeCN	41.05	0.786				75
Toluene	92.14	0.867				25

Procedure as describe in section 2.2. After 24 h no particles were formed. After 38 h still no particles formed. 0.04g of AIBN added again. It was left a total of 48 h. No polymer obtained.

➤ **MGR2.2 (NIP)**

Scale: 2 g Initiator: 2% w/w

Solvent: total amount 2% w/v. MeCN/toluene 75:25

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
-			0	0	0	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.04	
MeCN	41.05	0.786				75
Toluene	92.14	0.867				25

Procedure as describe in section 2.2. Particle size checked at 24 h and left in the incubator a total of 38 h. This polymer precipitated.

Weight of the polymer: 0.6168 g; yield: 31%

➤ **MGR3 (MIP-CAT)**

Scale: 2 g

Initiator: 4% w/w

Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0007	0.0728	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 0.8271 g; yield: 41.4%

➤ **MGR8.1 (MIP-CAT)**

Scale: 2 g

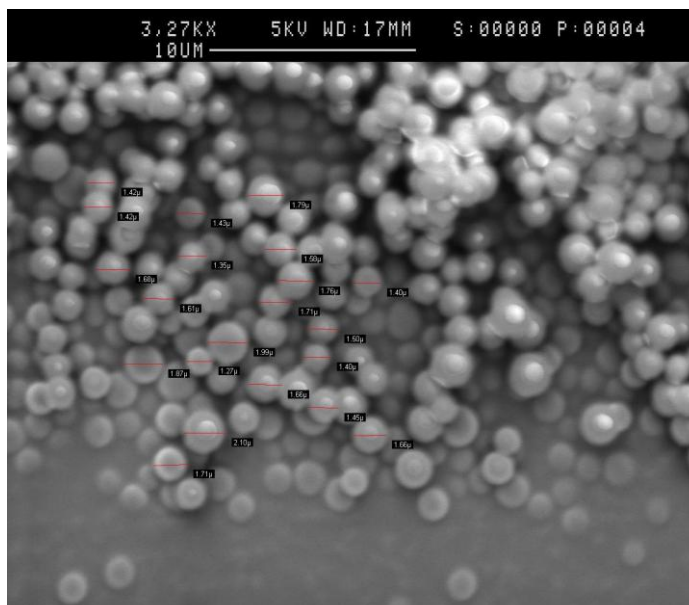
Initiator: 4% w/w

Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0007	0.0728	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 0.8732 g; yield: 43.66%

SEM image MGR8.1:



02:39PM Mon 17 Nov 2008

➤ **MGR8.2 (NIP)**

Scale: 2 g

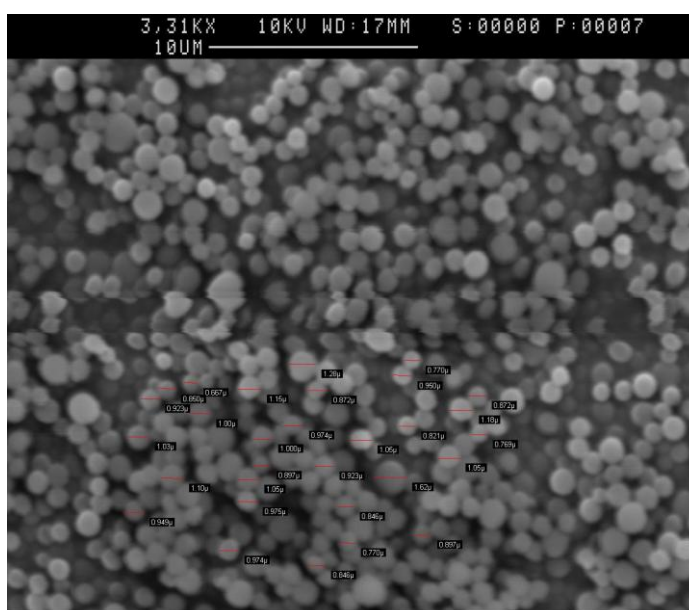
Initiator: 4% w/w

Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
-			0	0	0	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 1.3903 g; yield: 69.52%

SEM image MGR8.2:



02:47PM Mon 17 Nov 2008

➤ **MGR10 (MIP-HTY)**

Scale: 2 g

Initiator: 4% w/w

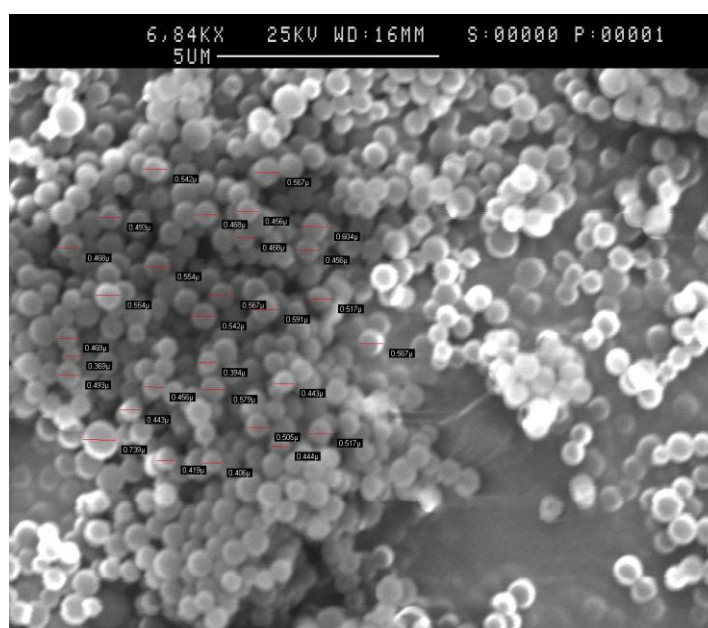
Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
HTY	154.16		1	0.0007	0.1019	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 1.3682 g; yield: 68.41%

Microanalysis results. 88.36 %C; 7.33 %H; 2.49 %N

SEM image MGR10:



02:43PM Mon 24 Nov 2008

➤ **MGR11 (MIP-TY)**

Scale: 2 g

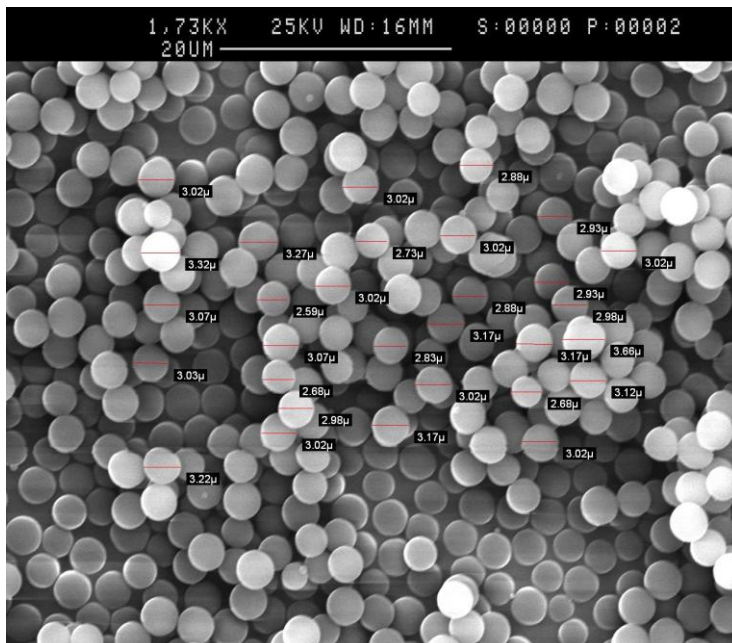
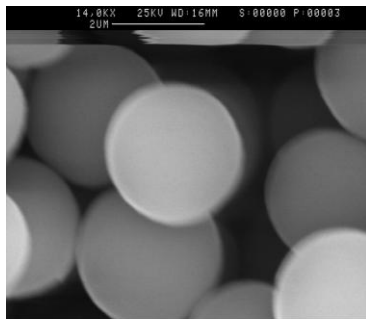
Initiator: 4% w/w

Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
TY	138.16		1	0.0007	0.0914	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 1.4538 g; yield: 72.69%

SEM image MGR11:



02:48PM Mon 24 Nov 2008

➤ **MGR12 (MIP-CAT)**

Scale: 2 g

Initiator: 4% w/w

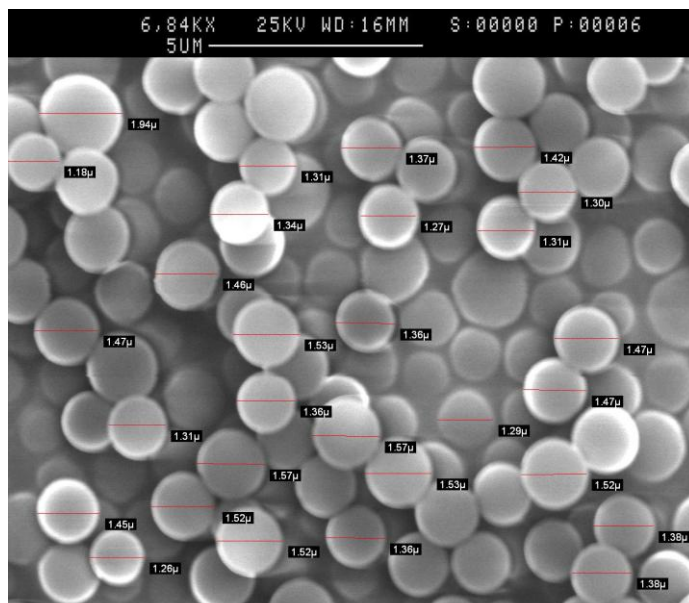
Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
CAT	110.11		1	0.0007	0.0728	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 1.1448 g; yield: 57.24%

Microanalysis results. 89.07 %C; 7.67 %H; 2.35 %N.

SEM image MGR12:



02:56PM Mon 24 Nov 2008

➤ **MGR13 (MIP-DOPAC)**

Scale: 2 g

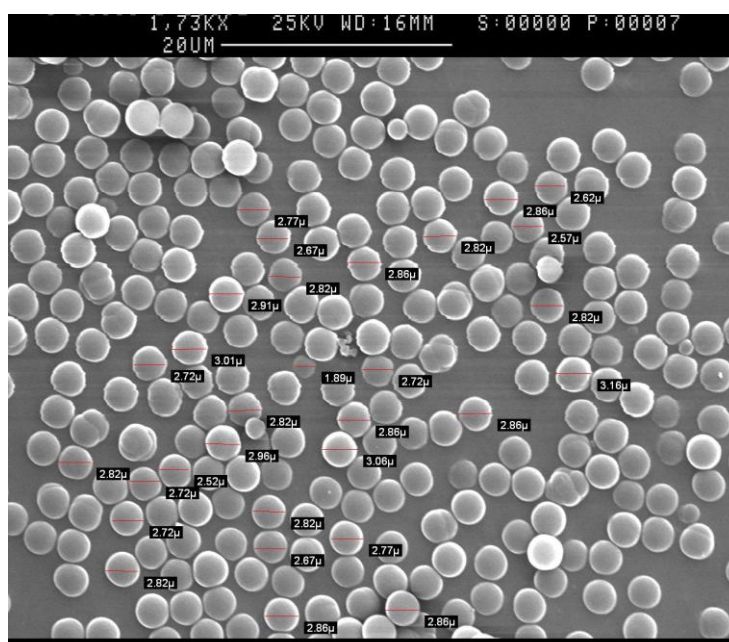
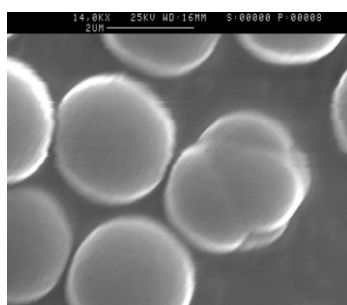
Initiator: 4% w/w

Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
DOPAC	168.15		1	0.0007	0.1112	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 1.2971 g; yield: 64.86%

SEM image MGR13:

➤ **MGR21 (MIP-DPPAC)**

Scale: 2 g

Initiator: 4% w/w

Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
DPPAC	182.18		0	0	0.1205	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

Weight of the polymer: 0.907g; yield: 45.35%

➤ **MGR14 (NIP)**

Scale: 2 g

Initiator: 4% w/w

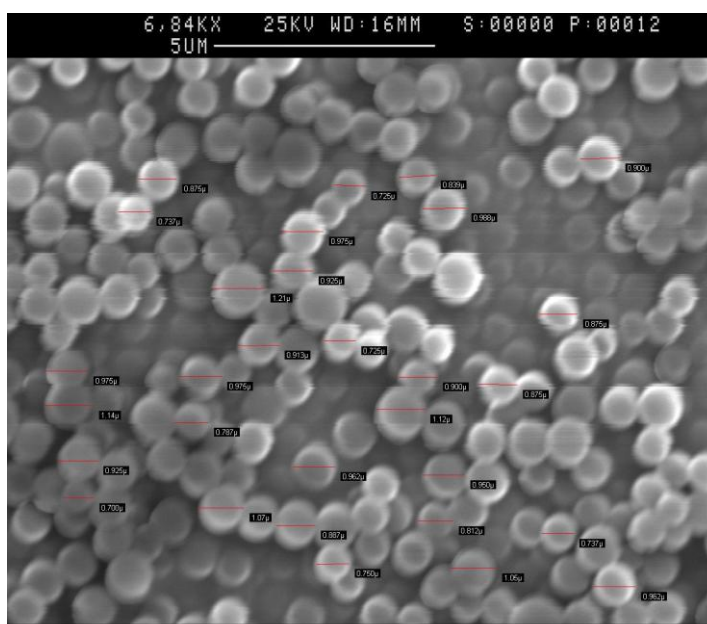
Solvent: MeCN, 4% w/v

Components	MW	Density	Mole Ratio	Moles	Weight	Volume
-			0	0	0	
VP	105.14	0.975	4	0.0026	0.2781	0.2852
DVB-80	130.19	0.914	20	0.0132	1.7219	1.8839
AIBN	164.21				0.08	
MeCN	41.05	0.786				50

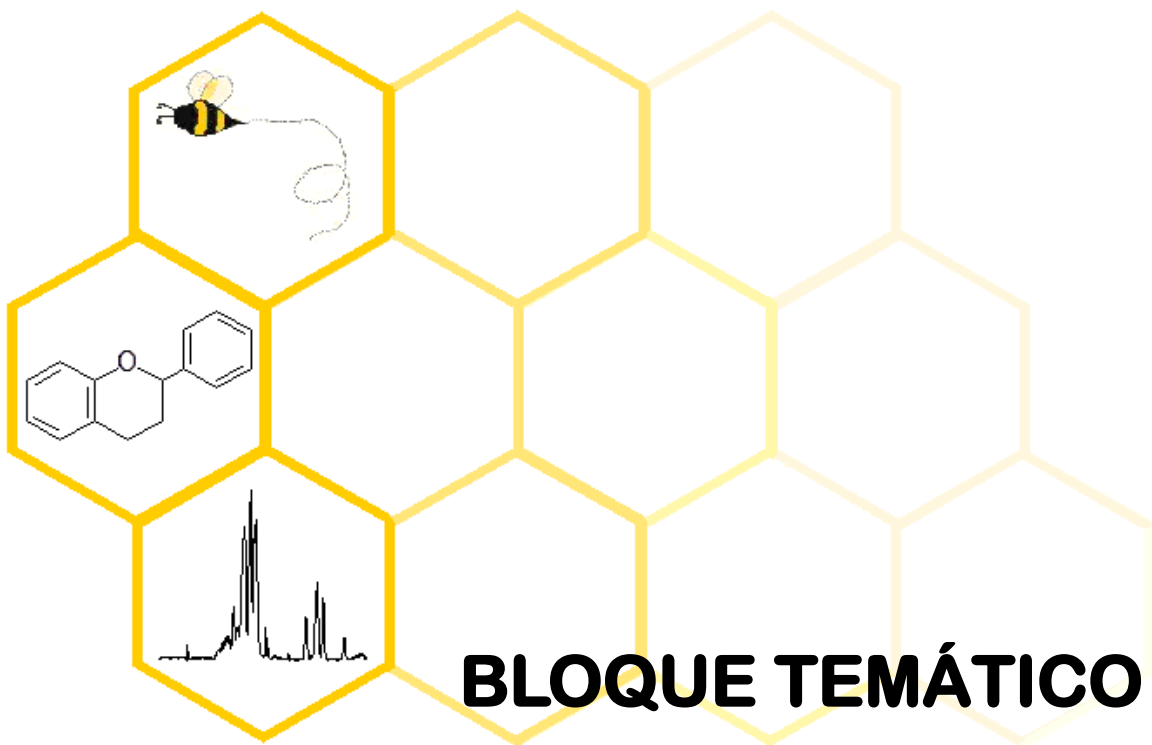
Weight of the polymer: 1.5967 g; yield: 79.84%

Microanalysis results. 88.57 %C; 7.82 %H; 2.45 %N.

SEM image MGR14:



03:14PM Mon 24 Nov 2008



BLOQUE TEMÁTICO II
DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS EN
PRODUCTOS DE LA COLMENA

CAPÍTULO 2

AVANCES EN EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PRODUCTOS DE LA COLMENA

En el primer capítulo de este bloque temático se realiza una revisión bibliográfica sobre los métodos analíticos publicados hasta 2006 (fecha en la que se escribió este trabajo) para la determinación de compuestos fenólicos en productos procedentes de la colmena. Entre ellos, y hasta esa fecha, sólo se había analizado el contenido de compuestos fenólicos en la miel y el propóleo, por lo que el trabajo se dividió en dos partes, cada una de ellas dedicada a uno de dichos productos.

En ambas partes se describen los métodos de preparación de muestra y las diferentes técnicas analíticas empleadas para el análisis de compuestos fenólicos, incluyendo desde las primeras determinaciones espectrofotométricas, hasta las más modernas técnicas separativas (cromatográficas y electroforéticas) acopladas a distintos sistemas de detección (sobre todo DAD y MS).

La calidad y las propiedades de la miel y el propóleo van a depender de su composición química, que a su vez depende del clima y del origen geográfico y floral de la zona donde las abejas realizan la recolección. La metodología analítica que confirme el origen de una miel o un propóleo no está totalmente establecida. Aún así, el estudio de los compuestos fenólicos que contiene ha resultado una herramienta muy útil a la hora de determinar su origen geográfico y botánico; de hecho, se han propuesto como posibles marcadores del origen floral tanto de la miel^{147,148} como del propóleo¹⁴⁹.

¹⁴⁷ Ferreres, F., Blázquez, M.A., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., *Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography*, J. Chromatogr. A 1994, 669, 268-274.

¹⁴⁸ Tomás-Barberán, F.A., Martos I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E., *HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys* J. Sci. Food Agric. 2001, 81, 485-496.

¹⁴⁹ Matsuda, A.H., de Almeida-Muradian, L.B., *Validated method for the quantification of artepillin-C in Brazilian propolis*, Phytochem. Anal. 2008, 19, 179-183.

Este trabajo se ha publicado en la revista *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* bajo el título “***Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees***”.

Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees

A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román,
A. Segura-Carretero*, A. Fernández-Gutiérrez*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Received 30 December 2005; received in revised form 2 March 2006; accepted 4 March 2006

Available online 18 April 2006

Abstract

Honey and propolis are rich in phenolic compounds, which act as natural antioxidants, and are becoming increasingly popular because of their potential role in contributing to human health. These compounds can also be used as indicators in studies into the floral and geographical origin of the honey and propolis themselves. We present here an overview of current analytical methods for measuring polyphenols in honey and propolis. The analytical procedure to determine individual phenolic compounds involves their extraction from the sample, analytical separation and quantification. The techniques reviewed are based on spectrophotometry as well as analytical separation techniques such as gas chromatography, high-pressure liquid chromatography and capillary electrophoresis.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phenolic compounds; Honey; Propolis; Analysis

1. Introduction about interest of phenolic analysis

Quality control, nutritional value and the monitoring of hazardous residues in foodstuffs have all become major topics of public interest [1]. The effects of growing conditions, processing, transport, storage, genetics and other factors concerning chemical and biochemical components are also important issues in food science [2]. In recent years there has been growing interest in functional foods, i.e. foods that can provide not only basic nutritional and energetic requirements but also additional physiological benefits [3]. The term “functional food” was used for the first time in Japan in the 1980s and was applied to processed food which contained ingredients that conferred the benefits of some physiological functions. Nowadays a functional food can be defined as a food that produces a beneficial effect in one or more physiological functions, increases well-being and/or decreases the risk of suffering from a particular medical condition. The functionality of a food is usually related to some of the ingredients that it contains and at present consumers prefer these

ingredients to have a natural rather than synthetic origin. Thus they are commonly extracted from plants, food by-products and other natural sources [4].

Among the functional ingredients the group most widely studied is the family of antioxidants. Traditionally, this kind of compounds have played an important role in food science and technology because of their usefulness in preserving foodstuffs against oxidative degradation [5]. Interest in antioxidant compounds has increased nowadays in the light of recent evidence regarding the important role of antioxidants in human health. In fact several preventative effects against different diseases such as cancer, coronary diseases, inflammatory disorders, neurological degeneration, aging, etc., have been related to the consumption of antioxidants [6,7].

Phenolic compounds or polyphenols, are one of the most important groups of compounds occurring in plants, where they are widely distributed, comprising at least 8000 different known structures [8]. Polyphenols are also products of the secondary metabolism of plants. These compounds are reported to exhibit anticarcinogenic, anti-inflammatory, anti-atherogenic, antithrombotic, immune modulating and analgesic activities, among others and exert these functions as antioxidants [9–13]. In general, phenolic compounds can be divided into at least 10 types depending upon their basic structure: simple phe-

* Corresponding authors. Tel.: +34 958 248593; fax: +34 958 249510.
E-mail addresses: ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero), albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

nols, phenolic acids, coumarins and isocoumarins, naphthoquinones, xanthenes, stilbenes, anthraquinones, flavonoids and lignins. Flavonoids constitute the most important polyphenolic class, with more than 5000 compounds already described [6].

Due to the importance of polyphenols in food this manuscript reviews their analysis in different products derived from bees. Several natural products are manufactured by bees to construct their hives and produce honey. These include beeswax, royal jelly, beebread, propolis and honey itself. There are no studies analysing the phenolic profile of beeswax, royal jelly and beebread and so this review confines itself to the analysis of polyphenols in honey and propolis.

In general, an analytical procedure for the determination of individual phenolic compounds involves three basic steps: extraction from the sample, analytical separation and quantification. Several methods have been developed to analyse polyphenols in honey and propolis: colorimetric reactions, thin-layer chromatography (TLC), gas chromatography (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) and lately, capillary electrophoresis (CE).

2. Honey

2.1. Introduction

Honey has been used as a food since the earliest times. Only in recent years, however, has evidence emerged of its antioxidant capacity [14]. It is also used as a food preservative [15–17], preventing deteriorative oxidation reactions in foods, such as lipid oxidation in meat [18,19] and the enzymatic browning of fruits and vegetables [20–22]. Antioxidants specifically retard deterioration, rancidity or discoloration due to oxidation caused by light, heat and some metals. Nevertheless, the antioxidant activity of honey varies greatly depending on the floral source [23,24] and external factors such as the season and environment, and finally its processing.

Honey is reported to contain at least 181 substances [25] and is considered as part of traditional medicine. Apitherapy has recently become the focus of attention as a form of folk and preventive medicine for treating certain conditions and diseases as well as promoting overall health and well being [26]. It has been reported to be effective in gastrointestinal disorders [27,28], in the healing of wounds and burns [29,30], as an antimicrobial agent [28–32] and to provide gastric protection against acute and chronic gastric lesions [33,34].

Honey is a supersaturated solution of sugars, to which the main contributors are fructose (38%) and glucose (31%). It also has a wide range of minor constituents, many of which are known to have antioxidant properties [35,36]. These include flavonoids and phenolic acids [37,38], certain enzymes (glucose oxidase, catalase) [25], ascorbic acid [25], Maillard reaction products [25], carotenoid-like substances [42], organic acids [37] and amino acids and proteins [39]. The natural antioxidants, especially flavonoids, exhibit a wide range of biological effects, including antibacterial, anti-inflammatory, anti-allergic, antithrombotic and vasodilatory actions [40].

The quality of honey is judged by its botanical or floral origin and chemical composition [37] and price of honey is based on its quality [41]. Traditionally, the floral source of a honey has been identified by the analysis of bee pollens present in the honey. Tan et al. however [42] have suggested that chemical approaches might be more accurate and easily undertaken in the characterisation of the floral source of a honey [43]. The analysis of their phenolic compounds, including flavonoids, has been suggested [44] and this technique tends to be used to study their floral and geographical origins. Before this, researchers tried to use the analysis of amino acids [38,45] to complement pollen analysis in the determination of the floral origins of honey. Even so, the analysis of phenolic compounds has been regarded as a very promising way of studying the floral and geographical origins of honeys [44–49]. In these studies, the flavanone hesperetin has been used as a marker for citrus honey [50–52], the flavonol kaempferol for rosemary honey [50,53] and quercetin for sunflower honey [54]. Some phenolic acids, such as ellagic acid in heather honey, have also been used as floral markers [37,55,56], and the hydroxycinnamates (caffeic, *p*-coumaric and ferulic acids) in chestnut honey [37]. Pinocembrin, pinobanksin and chrysin are the characteristic flavonoids of propolis and these flavonoid compounds have been found in most European honey samples [54]. In some honeys, such as those derived from lavender and acacia, no specific phenolic compounds have been found as suitable floral markers [54]. Other possible phytochemicals markers may be found, such as abscisic acid for heather honey [56]. Abscisic acid has also been detected in rapeseed, lime tree and acacia honeys [54]. A study of the phenolic contents of honey may also determine the presence of antimicrobial activity [57,58].

2.2. Sample preparation

Isolation of the phenolic compounds from the sample matrix is generally a prerequisite to any comprehensive analytic scheme, although enhanced selectivity in the subsequent quantification step may reduce the need for sample manipulation. The ultimate goal is the preparation of a sample extract uniformly enriched in all components of interest and free from interfering matrix components [59]. The extraction procedure used in most of the studies published is a solid phase extraction consisting of the following steps. The honey samples are mixed with five parts of water (pH 2 with HCl) until completely fluid and then filtered through cotton to remove solid particles. The filtrate is then passed through a column of Amberlite XAD-2 [60]. The phenolic compounds remain in the column while sugars and other polar compounds elute with the aqueous solvent, resulting in a flavonoid recovery of >95% [60,61]. The column is washed with acidic water (pH 2 with HCl) and subsequently with distilled water. The whole phenolic fraction is then eluted with methanol and dried under reduced pressure at 40 °C. There is a modification to this extraction in which the filtrate is mixed with Amberlite and stirred with a magnetic stirrer for 10 min before filling the column.

It is possible to carry out the next step, the clean-up, in two different ways. In the first one, the residue obtained after the evaporation of the methanol is resuspended in distilled water and extracted with diethyl ether. The ether extracts are combined and diethyl ether is removed by flushing with nitrogen. The dried residue is then redissolved in methanol and filtered [43,53,54,56,62–71]. In the second one, the residue is dissolved in methanol and the solution passed through a Sephadex LH-20 column. The phenolic fraction is evaporated to dryness under reduced pressure, redissolved in methanol and filtered [36,50,61,72,73].

Weston et al. [65] have demonstrated that phenolic acids seem to be eluted with the sugar fractions during the fractionation of honey on a XAD-2 column, as Ferreres et al. [74] mentioned that sugars and polar compounds were washed with water. In addition, by using diethyl ether, they aimed to eliminate the non-flavonoid phenolic compounds, which contaminated the flavonoid peaks; thus the main diethyl ether extract contents were flavonoids.

Aljadi et al. [75,76] recover the phenolic compounds from honey using a C18-SPE cartridge. Honey samples are prepared, subjected to base hydrolysis and extracted with ethyl acetate (liquid–liquid extraction) as described by Wahdan [77]. The fraction extracted with ethyl acetate is evaporated under dryness, then the dry honey extract is redissolved in acidified deionised water and the phenolics are adsorbed onto preconditioned isolute C18 columns. The cartridges are preconditioned by passing methanol and acidified water. The adsorbed phenolics are then eluted from the cartridges by passing methanol–water solution 25% (v/v) at a drop wise flow rate. The recovered fractions are combined, dried under nitrogen and subjected to further analysis. Extraction using a SPE-C18 cartridge is a simple technique that employs inexpensive disposable extraction columns and provides many advantages, such as a reduction of solvent consumption and high recoveries of the analytes.

Another type of solid-phase extraction for phenolic compounds in honey, used by Inoue et al. [26], is a GL-Pak PLS-2 cartridge. Honey samples are dissolved in distilled water. The sample solution is transferred into an SPE cartridge preconditioned with methanol and distilled water. This is then washed with water and eluted with methanol. The solutions are evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The samples are redissolved by adding methanol.

For the extraction of homogentisic acid from honey an aliquot of homogenized honey is dissolved in water in screw-capped tubes. Ethyl acetate is added to each tube and the mixture is agitated in a rotary shaker. The phases are allowed to separate and the organic extracts are centrifuged. After centrifugation, anhydrous sodium sulphate is added to the combined extracts and evaporated to dryness by a rotary evaporator. The residue is taken up with acetone and the acid isolated by preparative TLC using H_2SO_4 10^{-2}N ($R_f = 0.7$) [78].

To extract a similar quantity of honey an Amberlite XAD-2 column requires more solid phase than that used in the other different types of SPE but more phenolic compounds are identified than with the other types of SPE.

2.3. Spectrophotometric determination of phenolic compounds

The colorimetric assay based on the reaction of Folin-Ciocalteu reagent is a method widely used for the determination of total phenols in honey [17,75,79,80]. The method consists of calibration with a pure phenolic compound, extraction of phenols from the sample and the measurement of absorbance after the color reaction.

The main disadvantage of the colorimetric assay is its low specificity, as the color reaction can occur with any oxidizable phenolic hydroxy group. An interesting approach to the content of total extractable phenolic compounds in different food samples involving the comparison of chromatographic and spectrophotometric methods has recently been reported, accounting for the possible influence of other substances as interfering compounds [81].

A typical protocol using the Folin-Ciocalteu method could be as follows. Each honey sample is diluted with distilled water and filtered. This solution is then mixed with Folin-Ciocalteu reagent for 5 min and sodium carbonate is added. After incubation at room temperature the absorbance of the reaction mixture is measured at 760 nm against a methanol blank. Gallic acid is used as standard to produce the calibration curve. The mean of three readings is used and the total phenolic content is expressed in mg of gallic acid equivalents/100 g of honey [82]. A modification of the Folin-Ciocalteu method has been carried out by Vinson et al. [83].

2.4. Chromatographic determination of the phenolic profile of honey

The need for knowing the profiles and identifying individual honey compounds requires the replacement of traditional methods by separative techniques. High-performance liquid chromatography (HPLC) is without doubt the most useful analytical technique for characterizing polyphenolic compounds, though gas chromatography and capillary electrophoresis are used in some instances.

GC was employed in its beginnings in an attempt to facilitate the determination of polyphenolic compounds. It has been used to determine polyphenols in honey in some published studies [47,52,76]. GC–MS has also been employed for the analysis of flavonoids in honey and, in this case, the derivatization step was unnecessary [84].

Studies with HPLC are described in Table 1, giving mobile phases, type of elution employed, stationary phase, extraction system, detection system used, compounds identified and several pertinent observations. The HPLC mode most widely used has been reversed-phase HPLC. In this case the stationary phase consists of a non-polar octadecylsilane (C_{18}) bonded phase and the mobile phase is a polar solvent.

The majority of published chromatography studies describe the use of an elution mobile gradient phase in recognition of the complexity of the phenolic profile. Several mobile phases have been used but the most common are binary systems comprising an aqueous component and a less polar organic solvent.

Table 1
Separation of phenolic compounds of honey using HPLC methods

Column	Mobile phases	Elution	Detection	Extraction system	Identified compounds	Observations	Reference
XTerra RP18 (15 cm × 0.39 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (99.5:0.5); B: methanol	Gradient	DAD λ = 285 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, <i>p</i> -coumaric acid, <i>cis</i> - <i>trans</i> -abscisic acid, cinnamic acid, pinobanksin, quercetin, pinocembrin, kaempferol, chrysin, galangin	Antioxidants of honeys from various floral sources	[23]
Lichrocart RP-18 (18.1 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (95:5); B: methanol	Gradient	DAD λ = 280 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: Sephadex LH-20	Ellagic acid, myricetin, chalcone, glycoside, quercetin, luteolin, 8-methoxykaempferol, kaempferol, apigenin, isorhamnetin, pinocembrin, chrysin, genkwanin, tectochrysin	Flavonoids in <i>Apis mellifera</i> and <i>Melipona spp.</i> honeys	[36]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (95:5); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Myricetin, tricetin, quercetin, luteolin, quercetin 3-methyl ether, kaempferol, kaempferol 8-methyl ether, pinocembrin, quercetin 3,3'-dimethyl ether, isorhamnetin, chrysin, pinobanksin, tectochrysin	Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in <i>Leptospermum</i> honeys	[43]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Pinocembrin, pinobanksin, chrysin, galangin, tectochrysin, quercetin, kaempferol, 8-methoxykaempferol, caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, <i>cis</i> - <i>trans</i> -abscisic acid, ferulic acid, apigenin, quercetin 3,7-dimethyl ether, quercetin 3,3'-dimethyl ether, hesperetin	Flavonoid profile of European unifloral honeys	[54]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	<i>Trans</i> - <i>trans</i> -abscisic acid, <i>cis</i> , <i>trans</i> -abscisic acid, pinobanksin, pinocembrin, chrysin, galangin	Analysis of abscisic acid and flavonoids in heather honey	[56]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Pinobanksin, quercetin, luteolin, 8-methoxykaempferol, kaempferol, apigenin, isorhamnetin, pinocembrin, chrysin, galangin, tectochrysin	Analysis of 15 flavonoids in rosemary honey	[62]
Lichrocart RP-18 (10 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (95:5); B: methanol	Gradient	DAD λ = 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Quercetin glycoside, luteolin glycoside, 8-methoxykaempferol glycoside, kaempferol glycoside, quercetin, luteolin, methylated luteolin, 8-methoxykaempferol, isorhamnetin, genkwanin	Flavonoids in stinglessbee honey	[64]
LiChrospher 100 RP-18 (12 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (95:5); B: methanol	Gradient	UV λ = 270 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Caffeic acid, phenyllactic acid, methyl syringate, cinnamic acid, pinobanksin, pinocembrin, chrysin, galangin	Antibacterial phenolic components of manuka honey	[65]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Myricetin, tricetin, quercetin, luteolin, kaempferol	Flavonoids markers of <i>Eucalyptus</i> honey	[66]

Table 1 (Continued).

Column	Mobile phases	Elution	Detection	Extraction system	Identified compounds	Observations	Reference
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Myricetin, tricetin, quercetin, luteolin, quercetin 3-methyl ether, kaempferol, pinobanksin, pinocembrin, chrysin	Flavonoids in Eucalyptus Australian honeys	[67]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, <i>o</i> -coumaric, ferulic acid, ellagic acid, abscisic acid	Analysis of seven phenolic acids and two abscisic acid isomers in Eucalyptus honey	[68]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Myricetin, tricetin, quercetin, luteolin, quercetin 3-methyl ether, kaempferol, 8-methoxy kaempferol, pinocembrin, quercetin 3,3'-dimethyl ether, isorhamnetin, chrysin, pinobanksin, genkwanin	Flavonoids in Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Bansia and Helianthus honeys	[69]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Myricetin, tricetin, quercetin, luteolin, quercetin 3-methyl ether, kaempferol, kaempferol 8-methyl ether, pinocembrin, quercetin 3,3',-dimethyl ether, isorhamnetin, chrysin, pinobanksin	Quantitative analysis of Flavonoids in Australian Eucalyptus honeys	[70]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Gallic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid, ellagic acid, syringic acid	Phenolics acids in Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Bansia and Helianthus honeys	[71]
C ₁₈ (15 cm × 0.46 cm, 5 μm)	A: water:acetic acid (99:1); B: methanol:acetic acid (99:1)	Gradient	DAD λ = 280 nm	Extraction with ethyl acetate and SPE (C ₁₈)	Gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, benzoic acid, cinnamic acid	Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey	[76]
Discovery RP Amide C ₁₆ (15 cm × 0.46 cm, 5 μm)	A: water:acetic acid (95.5:0.5); B: methanol: acetic acid (95.5:0.5)	Gradient and isocratic	Multichannel Electrochemical detector and mass spectrometry	SPE: GL-Pak PLS-2 cartridge	Methyl syringate	Identification of phenolic compounds in manuka honey	[26]
Lichrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290 and 340 nm, NMR	SPE (Amberlite XAD-2) clean-up: extraction with diethyl ether	Ellagic acid, pinobanksin, hesperetin, quercetin, luteolin, 3-methylquercetin, 8-methoxykaempferol, kaempferol, apigenin, isorhamnetin, pinocembrin, phenylethyl caffeate, pinobanksin 3-acetate, dimethylallyl caffeate, quercetin 3,7-dimethyl ether, chrysin, galangin, galangin 3-methyl ether, myricetin 3,7,4',5'-methyl ether, pinocembrin 7-methylether, tecto-chrysin	Flavonoids in Tunisian honeys	[63]
Spherisorb ODS2 (25 cm × 0.46 cm, 5 μm)	Methanol/H ₂ SO ₄ 10 ⁻² N (10:90, v/v)	Isocratic	DAD λ = 292 nm NMR, MS	Extraction with ethyl acetate and TLC	Homogentisic acid	Determination of homogentisic acid in strawberry-tree honey	[78]

For example, a method available for the analysis of the phenolic fraction of honey is a reversed-phase HPLC using gradient elution with an aqueous solution of formic acid and methanol as solvents.

With regard to the detection system employed in HPLC, it should be emphasised that UV–vis detection with a diode array detector is undoubtedly the most common, although electrochemical detection systems [26,47,85–87] and mass detectors [26,78] have been used to a lesser extent.

The most frequent wavelengths used have been 290 and 340 nm. Because some phenolic compounds show several absorption maxima, the use of simultaneous multiple UV (photodiode array) is recommended for identification purposes, and also because this detector offers chromatograms at any wavelength accompanied by the absorption spectrum of each eluted band. In this way the absorption spectrum can be combined with retention parameters for the possible identification of an unknown compound as well as to measure the purity of the elution band in question. At 290 nm it is known that all polyphenolic compounds absorb, but nonetheless, some studies recommend using different wavelengths to achieve maximum sensitivity, and also, if possible, a suitable selectivity depending upon the polyphenolic compounds contained in the honey in question.

Polyphenols are usually identified by comparing retention times, UV spectra and chromatograms. NMR spectrometry is often also used as a complementary technique for structural assignment [56,63,66,78].

2.5. Electrophoretic determination of the phenolic profile

Capillary electrophoresis has also been used as an alternative technique to HPLC for the analysis of phenolic compounds in honey. CE combines short analysis times and high separa-

tion efficiency of polyphenols in honey. The use of this rapid analytical technique, allowing a faster screening of phenolic compounds, is highly recommended. The union of speed, resolution, simplicity and low operating costs make the technique an attractive option for the development of improved methods for determining phenolic compounds in honey.

Despite of the advantages that CE seems to have, there are few publications dealing with the determination of polyphenols in honey by this technique.

The operative modes used are borate-based CZE and borate-based micellar electrokinetic chromatography (MECK) with sodium dodecylsulfate (SDS) as micellar agent. The MECK methods study honey flavonoids [50,88] and the CZE method analyzes the whole polyphenolic fraction of honey [73].

A summary of optimized conditions of capillary electrophoresis methods (effective length of capillary, internal diameter of capillary, wavelength of detection, voltage, temperature, injection time, buffer concentration) where honey samples are analysed as well as the phenolic compounds studied are set out in Table 2.

3. Propolis

3.1. Introduction

Propolis, or bee glue, is a dark-coloured resinous substance collected by honeybees from leaf buds and cracks in the bark of various tree species [89]. Bees may also use material actively secreted by plants, or exuded from wounds in plants (lipophilic material on leaves, mucilages, gums, resins, lattices, etc.). Once collected, this material is enriched with salivary and enzymatic secretions. The resulting substance is used by bees to seal holes in their hives, strengthen the thin borders of the comb, exclude

Table 2
Summary of optimized conditions of capillary electrophoresis methods where honey samples are analyzed

Instrumental variables						Experimental variables			Identified compounds	References
L_{ef} (cm)	i.d. (μm)	λ_{d} (nm)	V (kV)	T ($^{\circ}\text{C}$)	t_{inj} (s)	Type of buffer	[Buffer] (mM)	pH		
63	70	280	20	30	2	Sodium borate/SDS + 10% methanol	200/50	8	Pinobanksin, naringenin, hesperetin, 8-methoxykaempferol, myricetin, quercetin, luteolin, eriodictyol, pinocembrin, kaempferol, apigenin, chrysin, galangin	[50]
63	50	340	21	25	2	Boric acid/SDS	200/50	8.5	Eriodictyol, naringenin, hesperetin, pinobankin, pinocembrin, myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, apigenin, chrysin, galangin, genkwanin, tectochrysin	[88]
50	50	280	20	30	–	Sodium borate + 20% methanol	100	9.5	Hydroxymethylfurfural, phenylethylcaffeate, dimethylallylcaffeate, pinobanksin, naringenin, hesperetin, cinnamic acid, chlorogenic acid, <i>m</i> -coumaric acid, quercetin, luteolin, syringic acid, ferulic acid, pinocembrin, <i>o</i> -coumaric acid, kaempferol, <i>p</i> -coumaric acid, apigenin, vanillic acid, chrysin, galangin, ellagic acid, rosmarinic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, caffeic acid, gallic acid, 2,4-dihydroxybenzoic acid	[73]

L_{ef} , effective length of capillary; i.d., internal diameter of capillary; λ_{d} , wavelength of detection; V , voltage; T , temperature; t_{inj} , injection time; [Buffer] buffer concentration.

draught and make the entrance of the hive weathertight or easier to defend. Propolis is also used as an “embalming” substance to cover hive invaders which the bees have killed but cannot transport out of the hive [90].

Propolis has been used extensively in folk medicine since it possesses various biological activities such as antiseptic, anti-fungal, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, anaesthetic and antioxidant properties [89,91,92] among others. It can increase the body's natural resistance to infections and lower blood pressure and cholesterol levels. Applied externally, propolis relieves various types of dermatitis. In addition, it is used in mouthwashes and toothpastes to prevent caries and treat gingivitis and stomatitis [93] and it is claimed to be useful in cosmetics and as a constituent of health foods [94].

The plant origin of propolis determines its chemical diversity. Bee glue's chemical composition depends on the species of local flora present at the site of collection and thus in the geographic and climatic characteristics at the site [95]. In the world's temperate zones the dominant propolis source is the bud exudate of poplar (*Populus*) [90,96] whereas in the tropical regions there are no poplars and bees have to find different plant sources for bee glue. In spite of possible differences in composition due to the different plant sources, most propolis samples share considerable similarity in their overall chemical nature. It is made up of 50% resin (composed of flavonoids and related phenolic acids), 30% wax, 10% essential oils, 5% pollen and 5% other organic compounds [97]. Polyphenols (including flavonoids, phenolic acids and their esters), due to their proven ability to inhibit specific enzymes, to simulate some hormones and neurotransmitters and to scavenge free radicals, are considered to be the main pharmacologically active molecules in propolis [98].

More than 180 compounds, mainly polyphenols, have been identified as constituents of propolis [94]. As mentioned already, the concentration of phenolic compounds may vary substantially according to the origin of the samples and such differences are likely to affect its biological activities and consequently its clinical properties [99]. Therefore the assay of these components is of great importance.

3.2. Sample preparation

Propolis cannot be used as a raw material; it must be purified by extraction with solvents. This process should remove the inert material and preserve the polyphenolic fractions. Extraction with ethanol is particularly suitable to obtain dewaxed propolis extracts rich in polyphenolic components [100] and this is the most commonly used solvent, especially at concentrations of 70% [101–108] and 80% [109–114], although other concentrations have also been used, such as 95% [115] and absolute ethanol [116,117]. Compared with absolute ethanol, extraction with aqueous ethanol results in wax-free tinctures, containing higher amounts of phenolic substances [118]. Park and Ikegaki [119] used various concentrations of ethanol as solvent and measured the absorption spectra of the different extracts. The 80% ethanolic extract showed highest absorption at 290 nm, which means that the highest concentration of flavonoids (especially of

kaempferide, acacetin and isorhamnetin) was liberated from the propolis when using this solvent. With other ethanol concentrations, however, it is possible to extract higher quantities of other flavonoids, for example, with 60% ethanol the most extracted compounds were isosakuranetin, quercetin and kaempferol; and with 70% ethanol, pinocembrin and sakuranetin.

Extraction with pure water [101,119,120] (these extracts are likely to contain phenolic acids which are very soluble in water), methanol [62,63,100,121], hexane and acetone [122,123] and chloroform [124] has also been used.

The analysis of raw propolis is more frequent than the analysis of commercial propolis preparations [100,114,121,125]. The preparation of crude propolis begins by dehydrating the sample so that the dried propolis (cooled) can be ground into a fine powder. Then, in one procedure, a weighted sample is dissolved in the solvent (the most frequently used proportion is 1:10, w/v) and left for 24 h at room temperature [63,105,107,108,111,114,117,126]. It is then filtered and the procedure repeated several times [103,104,106,121] as successive extractions ensure the complete recovery of the phenolics. Alternatively, the sample is dissolved by shaking at 70 °C for 30 min [112,113,119]. After dissolution the insoluble portion is separated by filtration and the solvent is then evaporated to dryness under reduced pressure [63,103,104,107,108] and redissolved. Instead of this, the mixture can be centrifuged to obtain the supernatants [111,112,114,115,119,121,126], which can then be directly used for analysis.

It must be stressed that, as in any analytical study, sampling is extremely important, because this procedure determines the final result.

3.3. Spectrophotometric determination of phenolic compounds

The increasing use of propolis preparations in medicine requires the development of suitable approaches for the quantitative determination of their active components. Rapid spectrophotometric methods are assumed to be especially useful for the routine control of propolis [111,118,127,128]. These methods are aimed at the determination of either total flavonoids and total phenolics [118,127] or total flavanones/dihydroflavonols and total flavones/flavonols [128].

Popova et al. [106] pointed out that the quantification of the active compounds within groups with the same or close chemical structures correlates better with their biological activity and is more informative than the quantification of individual components. They assume, therefore, that this is a correct approach to characterising and standardising propolis preparations. Other advantages are its simplicity, good repeatability and acceptable accuracy.

Quantitative determinations of flavonoids in propolis are conducted by two colorimetric methods [129]. The aluminium chloride method is used to determine the flavone and flavonol content; it is based on the formation of a complex between the aluminium ion Al(III) and the carbonyl and hydroxyl groups of the flavonoid. The test solution, methanol and aluminium chloride in methanol (w/v) are mixed and left for 30 min. The

absorbance is then measured at 425 nm [106,127]. To quantify flavanones and dihydroflavonols the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) method is used. This is based upon the interaction of these compounds with DNP in acidic media to form coloured phenylhydrazones. The test solution and DNP solution diluted with methanol are heated at 50 °C for 50 min in a water bath. After cooling to room temperature, the mixture is diluted with potassium hydroxide in methanol (w/v). The resulting solution is diluted with methanol. Absorbance is measured at 486 nm [128,129]. The sum of flavonoid contents determined by the above two methods closely represents the real content of total flavonoids [129].

It is possible to determine the total flavonoid content with the Folin-Ciocalteu method, which is the most widely used for the spectrophotometric quantification of total phenolics [130]. Briefly, the test solution, distilled water, Folin-Ciocalteu reagent and sodium carbonate solution are mixed. The sample is left for incubation and the absorbance is measured at 760 nm [106,117].

3.4. Chromatographic determination of the phenolic profile of propolis

The complete characterization of propolis activity involves both qualitative and quantitative chemical analysis. Chromatographic techniques such as fine chromatography, gas and, in particular, HPLC provide the profile and identification of the individual phenolic compounds. They are discussed in this section. Special attention is given to detection systems, due to their importance in the characterization of polyphenolic compounds. Detection is routinely achieved by ultraviolet absorption, often involving a photodiode array detector. Coupled techniques, particularly mass spectroscopy, are being used increasingly for routine work.

3.4.1. Thin-layer chromatography

In TLC, the choice of stationary phase as well as a suitable solvent depends upon the polyphenolic structures being studied.

A classical stationary phase of silica gel (precoated plates) is widely used [108–113,131,132] to separate more apolar flavonoids such as flavonols and isoflavonoids [81]. Samples are eluted with different mobile phases: ethanol/water (55:45, v/v) [110,112], petroleum ether/ethyl acetate (70:30) [108], petroleum ether/acetone/formic acid (35:10:5) [132], chloroform/ethyl acetate (60:40) [113], toluene/chloroform/acetone (40:25:35) [111], *n*-hexane/ethyl acetate/acetic acid (31:14:5) [111,132,133] or (60:40:3) [111] and chloroform/methanol/formic acid (44.1:3:2.35) [131].

Medic-Saric et al. [133] used two-dimensional TLC with densitometric evaluation with *n*-hexane/ethyl acetate/glacial acetic acid (31:14:5, nu/nu) (System A) and chloroform/methanol/formic acid (44:3.5:2.5) (System B) as mobile phases.

Visualization is performed in short- and long-wavelength UV light and in some cases spraying with different reagents. A common wavelength is 366 nm [108,110,112,132].

3.4.2. Gas chromatography

GC determines phenolic compounds both qualitatively and quantitatively. It is usually necessary, however, to derivatize the compounds to make them suitable for GC analysis. During the last 10 years GC has been extensively employed by several researchers [103–105,108,124,134–147]. An alternative is high-temperature, high-resolution gas chromatography (HT-HRGC) [107,112,122,123,148], which is an established technique for separating complex mixtures and identifying high-molecular-weight compounds that do not elute when analysed on ordinary GC columns.

GC coupled with mass spectrometer (MS) is the method most widely used, since MS allows the acquisition of molecular mass data and structural information together with the identification of compounds. Propolis, however, contains components that are not volatile enough for direct GC–MS analysis even upon derivatization or HT–GC–MS [116]. Table 3 shows some GC temperature ranges used, characteristics of the column employed, analysis time, detection system, type of derivatization, compounds identified and several observations about a few notable published works.

3.4.3. Liquid chromatography and high-performance liquid chromatography

High-performance liquid chromatography (HPLC) currently represents the most popular and reliable analytical technique for the characterization of polyphenolic compounds, as witnessed by the number of papers published on the subject. HPLC coupled to MS, and even to nuclear magnetic resonance spectroscopy (RMN), has improved the analysis of non-volatile species and allows us to establish definitive structures [149].

Electrospray ionisation (ESI) [150] permits the direct ionisation and transference of molecules to mass spectrometers and has extended the applicability of MS for a variety of new classes of molecules with thermal instability, high polarity and high mass.

Mirodikawa et al. [120] have established a suitable LC–MS method for the determination of the chemical constituents and therefore the quality of propolis.

Several authors have analysed polyphenolic compounds in propolis of diverse origins using different HPLC methods with different extraction systems and coupling diverse detector systems [62,63,100,106,109,110,112,113,115,117,119,126,134,146,151–157]. Table 4 summarises the information provided by some representative papers and gives the characteristics of the column employed, the mobile phases, the type of elution employed, the detection and extraction systems used, compounds identified and several pertinent observations.

3.5. Capillary electrophoresis analysis of phenolic compound in propolis

Because of the previously mentioned characteristics of capillary electrophoresis, this technique could well prove to be an interesting choice for the analysis of phenolic compounds. Nevertheless, to our knowledge, there are few reports about its use

Table 3
GC conditions for determination of phenolic compounds in propolis

Temperature range (°C)	Column	Analysis time (min)	Detection	Derivatization	Identified compounds	Observations	Reference
85–310	DB1 column (30 m × 0.32 mm i.d.)	85	MS	Pyridine + BSTFA	Pinostrobin chalcone, hexamethoxy flavone, pinostrobin, pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin 3-acetate, chrysin, galangin, naringenin, dihydrocinnamic acid, cinnamic acid, <i>p</i> -coumaric acid, isoferulic acid, ferulic acid, caffeic acid	Composition and activities of Egyptian propolis	[103,104]
100–310	HP5-MS capillary column (23 m × 0.25 mm i.d.), 0.5 mm film thickness	42	MS	Pyridine + BSTFA	Pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin <i>O</i> -acetate, chrysin, galangin, pentenyl caffeates, benzyl caffeates, phenethyl caffeate	Composition of European propolis	[105]
100–310	HP5-MS capillary column (23 m × 0.25 mm i.d.), 0.5 μm film thickness	42	MS	Pyridine + BSTFA	Cinnamic acid, benzyl cinnamate, cinnamyl cinnamate, pinocembrin, pinobanksin, pinobanksin 3-acetate, chrysin, galangin, phenylethyl caffeate, cinnamyl caffeate, vanillin, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid, dehydroabiatic acid	Composition and antibacterial activity of Turkish propolis TLC analysis too	[108]
50–285	HP1 methyl silicone capillary column (25 m × 0.25 mm i.d.)	55	MS	Methylation	Cinnamic acid, vanillin, ethyl cinnamate, vanillic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid, ethyl ferulate, 3-methylbut-2-enyl ferulate, 3-methylbut-3-enyl ferulate	Major organic constituents in New Zealand propolis. HPLC analysis too	[134]
40–390	Borosilicate capillary column (20 mm × 0.3 mm i.d.) coated with PS-086 ^a (<i>d_f</i> = 0.1 μm) connected to a 2 m piece of 0.25 mm i.d., high-temperature fused silica (which served as an interface)	54	MS	BSTFA	Ethyl hydrocinnamate, hydrocinnamic acid, inositol, cinnamic acid, ferulic acid, caffeic acid, pinostrobin	Composition and microbicidal activity of Brazilian and Bulgarian propolis	[107]
50–285	CBP5 column (30 m × 0.25 mm i.d.)	55	MS	Methylation	Coumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, kaempferol, apigenin, isosakuranetin, pinocembrin, dimethylallyl caffeic acid, pinobanksin 3-acetate, chrysin, galangin, kaempferide, tectochrysin	Propolis and plant resins HPLC and TLC analysis too	[112]
40–390	Glass column (22 m × 0.2 mm i.d.) coated with PS-086 ^a	54	FID MS	Trimethylsilylation: bis (trimethylsilyl)-trifluoro acetamide (BSTFA)	Inositol, <i>p</i> -cinnamic acid, ferulic acid, isoferulic acid, caffeic acid	Flavonoids in acetone no derivatized, derivatization of methanol extract	[122]
40–380 ^b	Fused silica capillary (10 m × 0.3 mm i.d.) coated with 0.1 μm film of Silaren-30 ^c	55	FID MS	No	Hydrocinnamic acid, vanillin, cinnamic acid, benzyl cinnamate, naringenin	Hexane and acetone crude extracts	[123]
40–370 ^d		50			3',4'-dimethoxy, betuleol, kaempferid		

^a 15% phenyl, 85% methyl polysiloxane.

^b Program A.

^c 30% diphenylpolysiloxane, 40% sildiphenylene ether, 30% dimethyl polysiloxane.

^d Program B.

Table 4
HPLC conditions for determination of phenolic compounds in propolis

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction system	Identified compounds	Observation	References
LiChrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290, 340 nm	In MeOH for 2 h at room temperature	Pinobanksin, quercetin, 8-methoxykaempferol, kaempferol, apigenin, isorhamnetin, quercetin 3,3'-dimethyl ether, pinocembrin, quercetin 7,3'-dimethyl ether, chrysin, galangin, techtochrysin	Flavonoids in rosemary nectar, honey and propolis	[62]
LiChrocart RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 5 μm)	A: water:formic acid (19:1, v/v); B: methanol	Gradient	DAD λ = 290, 340 nm	In MeOH for 24h at room temperature, evaporated and redissolved in MeOH	Pinobanksin, pinocembrin, phenylethyl caffeate, pinobanksin 3-acetate, dimethylallyl caffeate, chrysin, galangin, myricetin 3,7,4',5'-methyl ether, pinocembrin 7-methyl ether	Phenolics in Tunisian honey and propolis	[63]
Spherisorb ODS-2 (25 cm × 0.7 cm, 5 μm)	Methanol:water (58:42, v/v)	Isocratic	UV, EIMS, NMR	In a Soxhlet apparatus with MeOH, centrifuged, evaporated, clean-up	Myricetin 3,7,4',5'-methyl ether, pachypodol	One fraction of the chromatographed sample is purified by semipreparative HPLC	[63]
Symmetry C ₁₈ column (22 cm × 0.46 cm, 5 μm)	A: 30 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 3); B: acetonitrile	Gradient	PAD λ = 265, 290, 360 nm	Commercial preparations diluted in MeOH	3,4-Dihydroxy-cinnamic acid, 4-hydroxy-cinnamic acid, 3-hydroxy-cinnamic acid, quercetin, kaempferol, galangin, naringenin, pinocembrin, chrysin	Quality control of commercial propolis APCI mass spectra obtained	[100]
Intersil 5 ODS-2 column (25 cm × 0.46 cm i.d.) with a Chromosphere ODS guard column (1 cm × 0.3 cm i.d.)	A: water: acetic acid (95:5, v/v); B: methanol	Gradient	UV λ = 290 nm	In 70% EtOH for 24 h at room temperature (×2)	Flavones and flavonols, flavanones and dihydroflavonols and total phenolics (caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid, kaempferol, pinocembrin, phenethyl caffeate, isopentyl caffeate, chrysin, galangin, pinostrobin, benzyl caffeate)	Active constituents of poplar-type propolis; verification of the spectrophotometric quantification results.	[106]
YMC Pack ODS-A (RP)	Acetic acid:methanol:water (5:75:60, v/v/v)	Isocratic	DAD λ = 254 nm	In 80% EtOH for 30 min at 70 °C, centrifuged	Quercetin, kaempferol, apigenin, isorhamnetin, rhamnetin, pinocembrin, sakuranetin, isosakuranetin, chrysin, acacetin, galangin, kaempferide, tectochrysin	Antimicrobial activity of Brazilian propolis; TLC analysis too	[110]
YMC Pack ODS-A RP-18 (25 cm × 0.46 cm, 5 μm)	A: water; B: methanol	Gradient	DAD λ = 268 nm	In 80% EtOH for 30 min at 70 °C, centrifuged	Coumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, kaempferol, apigenin, isosakuranetin, pinocembrin, dimethylallyl caffeic acid, pinobanksin 3-acetate, chrysin, galangin, kaempferide, techtochrysin	Botanical origin and composition of Brazilian propolis; TLC, GC analysis too	[112]
ODS column (25 cm × 0.4 cm i.d., 5 μm)	A: H ₂ O:0.1% H ₃ PO ₄ ; B: CH ₃ CN:0.1% H ₃ PO ₄	Gradient	UV λ = 254 nm	Aqueous-ethanolic extract and partition between immiscible solvents	Evidenced the presence of phenolic compounds by the intense fluorescence	Antibacterial activity of Brazilian propolis. TLC analysis too	[113]
Superspher 100 RP-18 (12.5 cm × 0.4 cm, 4 μm)	A: Methanol:acetic acid, 1 M (50:50); B: Methanol:acetic acid, 1 M (40:60); C: acetonitrile	Gradient	UV λ = 254 nm	In 95% EtOH for 7 days at room temperature, centrifuged, evaporated and redissolved	Pinocembrin, galangin	Activity against <i>Streptococcus pyogenes</i> of Italian propolis	[115]

Table 4 (Continued).

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction system	Identified compounds	Observation	References
YMC Pack ODS-A (RP)	Acetic acid:methanol:water (5:75:60, v/v/v)	Isocratic	DAD $\lambda = 254$ nm	In 10–95% EtOH for 30 min at 70 °C, centrifuged; in water too	Isosakuranetin, sakuranetin, quercetin, kaempferol, pinocembrin, kaempferide, acetin, isorhamnetin	Evaluation of the preparations to see which have maximum absorption	[119]
Capcell Pak ACR 120 C ₁₈ column (25 cm \times 0.2 cm i.d., 5 μ m)	A: 0.1% formic acid:water; B: 0.08% formic acid:acetonitrile	Gradient	PAD $\lambda = 195$ –650 nm MS (ESI)	In EtOH for 24 h at room temperature, centrifuged	Caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, quercetin, pinobansin 5-methyl ether, apigenin, kaempferol, pinobanksin, cinnamylideneacetic acid, chrysin, pinocembrin, galangin, pinobanksin 3-acetate, phenethyl caffeate, tectochrysin, artepillin C	Antioxidant activity of propolis of various geographic origins	[126]
Capcell Pak ACR 120 C ₁₈ column (25 cm \times 0.2 cm i.d., 5 μ m)	A: 0.1% formic acid:water; B: 0.1% formic acid:acetonitrile	Gradient	PDA $\lambda = 195$ –650 nm MS (ESI)	In EtOH for 24 h at room temperature, centrifuged	Caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, pinobansin 5-methyl ether, apigenin, kaempferol, pinobanksin, cinnamylideneacetic acid, chrysin, pinocembrin, galangin, pinobanksin 3-acetate, phenethyl caffeate, cinnamyl caffeate, tectochrysin	Antioxidant activity of propolis from Korea; colorimetric measurements too	[117]
LiChrospher 100 RP-18 (11.9 cm \times 0.4 cm, 5 μ m)	(1) A: formic acid; B: methanol; (2) A': H ₃ PO ₄ (pH 2.0); B': MeCN	Gradient	PAD $\lambda = 268$ nm	Samples supplied as ethanolic tinctures	Cinnamic acid, pinobanksin, pinocembrin, pinobanksin 3-acetate, 1,1'-dimethylallylcaffeic acid, chrysin, galangin, pinocembrin 7-methyl ether, chrysin 7-methyl ether, galangin 7-methyl ether	Major organic constituents in New Zealand propolis; GC–MS analysis too	[135]
YMC PACK ODS column (25 cm \times 2 cm)	0.1% trifluoroacetic acid in CH ₃ CN:H ₂ O (6:4)	Isocratic	UV, MS, 2D NMR	In EtOH for 12 h at room temperature, concentrated	Isonymphaeol-B, nymphaeol-A, nymphaeol-B, nymphaeol-C	New prenylflavonoid isolated from propolis from Okinawa; structure determined; extract previously chromatographed	[149]
Chromsep RP-18 (25 cm \times 0.46 cm i.d., 5 μ m)	A: methanol; B: water:acetonitrile (97.5:2.5, v/v)	Gradient	UV $\lambda = 310$ nm	–	Chrysin and others	Establishing ideal conditions for analysis	[155]

Table 5
CE conditions for determination of phenolic compounds in propolis

Instrumental variables						Experimental variables			Identified compounds	References
L_{ef} (cm)	i.d. (μm)	λ_{d} (nm)	V (kV)	T ($^{\circ}\text{C}$)	t_{inj} (s)	Type of buffer	[Buffer] (mM)	pH		
56	50	200 (DAD)	30	25	2	(a) Sodium phosphate (b) Sodium borate	25	(a) 7 (b) 9.3	(a) 3,4-Dimethoxycinnamic acid, <i>p</i> -coumaric acid, cinnamic acid, benzoic acid (b) Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate, propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate, <i>p</i> -coumaric acid, cinnamic acid, benzoic acid	[102]
50	75	214	18	25	4	Borate + 0.5%MeOH	100	9.5	Rutin, chrysin, myricetin, kaempferol, hesperetin, daidzein, genistein, apigenin, quercitrin, luteolin, galangin	[114]
50	75	262	23	25	12	$\text{H}_3\text{BO}_3\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	40–60	9.2	Rutin, ferulic acid, apigenin, luteolin, quercetin, caffeic acid	[121]
50	50	254	15	25	–	Sodium tetraborate	30	9	Pinocembrin, acacetin, chrysin, catechin, naringenin, galangin, luteolin, kaempferol, apigenin, myricetin, quercetin, cinnamic acid, caffeic acid, resveratrol	[125]
56	50	200 (DAD)	30	25	2	Borate/SDS + 10% (v/v) acetonitrile	25/50	9.3	Pinocembrin, chrysin, galangin	[102]
50	75	214	–15	25	4	Sodium borate/SDS	30/50	8.5	Unsatisfactory conditions in the separation of some flavonoids	[114]
55	50	214	14	–	8	Borax/SDS + 5% (v/v) EtOH	30/12	9	Hesperetin, cinnamic acid, nicotinic acid	[158]

L_{ef} , effective length of capillary; i.d., internal diameter of capillary; λ_{d} , wavelength of detection; V , voltage; T , temperature; t_{inj} , injection time; [Buffer] buffer concentration.

with propolis and so far its applications are basically on the determination of flavonoids.

Different modes of operation are applicable with CE. Capillary zone electrophoresis (CZE) [102,114,121,125] is based on differences in the electrophoretic mobility of compounds caused by their charge and size. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [102,114,141,158], in which surfactants such as sodium dodecyl sulphate (SDS) are added to the separation buffer, is also capable of separating neutral compounds.

The effects of some of the variables, such as buffer pH, buffer concentration, separation voltage and injection time, are studied in order to optimize the analytical conditions [114,121,158]. A summary of the optimized conditions of CE methods is provided in Table 5.

As flavonoids are weakly acidic their separation requires a buffer of $\text{pH} > 10$ to be successful. Chi et al. [99] determined flavonoids and phenolic acids in propolis by CZE using a buffer with $\text{pH} 10.1$. Nonetheless, important flavonoids such as myricetin and quercetin, for instance, may decompose in such an alkaline medium [50]. Therefore, if possible MEKC is used for the determination of flavonoids in natural samples [102].

4. Conclusions

The quality of honey and propolis depends on its chemical composition and floral origin. Their polyphenolic content is strongly affected by the floral, geographical origin and climatic characteristic of the site. For this reasons, the identification and

quantification of the polyphenols of honey and propolis are of great interest.

Furthermore, they have a very important antioxidant capacity that is provided by polyphenols such as flavonoids and phenolic acids. These antioxidants report beneficial effects in human health. It has been commented that consumption of these bee products contributes to the treatment of stomach ulcer, sore throat and wounds and burns. Numerous studies have proven their versatile pharmacological activities: antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, hepatoprotective, antioxidant, antitumor, etc.

As a result, many analytical procedures have been carried out directed towards the determination of the complete phenolic profile of honey and propolis. The techniques employed in the last years have been GC, HPLC and CE, mainly combined with diode array detection and mass spectrometry

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge contract C019 of the Consejería de Agricultura y Pesca of the Junta de Andalucía. They also gratefully acknowledge the financial support of Project CTQ2005-01914/BQU and the Ministerio de Educación y Ciencia for the grant AP-2004-5488.

References

- [1] E. Ibáñez, A. Cifuentes, Crit. Rev. Food Sci. 41 (2000) 413–450.

- [2] F.J. Señorans, E. Ibáñez, A. Cifuentes, *Crit. Rev. Food Sci.* 43 (2003) 507–526.
- [3] I. Goldberg, *Fuctional Foods. Designer Foods, Pharmafood, Nutraceuticals*, Chapman and Hall, London, UK, 1996.
- [4] M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 883–897.
- [5] D.L. Madhavi, R.S. Singhai, P.R. Kulkarni, in: D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe (Eds.), *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [6] J. Wollgast, E. Anklam, *Food Res. Int.* 33 (2002) 423–447.
- [7] D.V. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe, in: D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe (Eds.), *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [8] L. Bravo, *Nutr. Rev.* 56 (1998) 317–333.
- [9] A.L. Catapano, *Angiology* 48 (1997) 39–44.
- [10] K. Loku, T. Tsushida, Y. Takei, N. Nakatani, J. Terao, *Biochim. Biophys. Acta* 1234 (1995) 99–104.
- [11] N. Salah, N.J. Millar, G. Paganda, L. Tijburg, G.P. Bolwell, C. Rice-Evans, *Arch. Biochem. Biophys.* 322 (1995) 339–346.
- [12] M. Serafini, A. Ghiselli, A. Ferro-Luzzi, *Eur. J. Clin. Nutr.* 50 (1996) 28–32.
- [13] J.A. Vinson, Y. Hao, X. Su, L. Zubik, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3630–3634.
- [14] FAO, FOA Agricultural Services Bulletin, FAO, Rome, Italy, 1996.
- [15] T. Cherbuliez, *The Medicine from the Bees*, CD-ROM, Apimondia, 2001.
- [16] T. Cherbuliez, R. Domerego, *Médecine des Abeilles*, editions Amyris, 2003.
- [17] A. Meda, C.E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, O.G. Nacoulma, *Food Chem.* 91 (2005) 571–577.
- [18] S.M. Anthony, J.R. Rieck, P.L. Dawson, *Poult. Sci.* 79 (2000) 1846–1850.
- [19] J. McKibben, N.J. Engeseth, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 592–595.
- [20] J. Oszmianski, C.Y. Lee, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 1892–1898.
- [21] M.R. McLellan, R.W. Kime, C.Y. Lee, T.M. Long, *J. Food Process. Preserv.* 19 (1995) 1–8.
- [22] L. Chen, A. Mehta, M. Berenbaum, A.R. Zangerl, N.J. Engeseth, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4997–5000.
- [23] N. Gheldof, N.J. Engeseth, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3050–3055.
- [24] S. Frankel, G.E. Robinson, M.R. Berenbaum, *J. Apic. Res.* 37 (1998) 27–31.
- [25] J.W. White, in: E. Crane (Ed.), *Honey. A Comprehensive Survey*, Heinemann, London, 1975, pp. 157–207.
- [26] K. Inoue, S. Murayama, F. Seshimo, K. Takeba, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *J. Sci. Food Agric.* 85 (2005) 872–878.
- [27] I.E. Haffeejee, A. Moosa, *BMJ* 290 (1985) 1886–1887.
- [28] S.P. Ladas, D.N. Haritos, S.A. Raptis, *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (1995) 1212–1215.
- [29] S.E. Efem, *Br. J. Surg.* 75 (1988) 679–681.
- [30] M. Subrahmanyam, *Br. J. Surg.* 78 (1991) 497–498.
- [31] K.L. Allen, P.C. Molan, G.M. Reid, *J. Pharm. Pharmacol.* 43 (1991) 817–822.
- [32] A.T. Ali, M.N. Choudhury, M.S. Al-Humayyd, *Trop. Gastroenterol.* 12 (1991) 73–77.
- [33] A.T. Ali, *Scad. J. Gastroenterol.* 26 (1991) 281–288.
- [34] A.T. Ali, *Trop. Gastroenterol.* 16 (1995) 18–26.
- [35] S.M. Antony, I.Y. Han, J.R. Rieck, P.L. Dawson, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3985–3989.
- [36] P. Vit, C. Soler, F.A. Tomás-Barberán, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 204 (1997) 43–47.
- [37] A. Cherchi, L. Spanedda, C. Tuberoso, P. Cabras, *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 59–64.
- [38] A.M.C. Davies, R.G. Harris, *J. Apic. Res.* 21 (1982) 168–173.
- [39] J.W. White, *J. Apic. Res.* 17 (1978) 234–238.
- [40] N.C. Cook, S. Sammon, *Nutr. Biochem.* 7 (1996) 66–76.
- [41] P. Andrade, F. Ferreres, M.T. Amaral, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 20 (1997) 2281–2288.
- [42] S.T. Tan, A.L. Wilkins, P.T. Holland, T.K. McGhie, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 1217–1221.
- [43] L. Yao, N. Datta, F.A. Tomás-Barberán, F. Ferreres, I. Martos, R. Singanusong, *Food Chem.* 81 (2003) 159–168.
- [44] M.J. Amoít, S. Aubert, M. Gonnet, M. Tacchini, *Apidologie* 20 (1989) 115–125.
- [45] A.M.C. Davies, *J. Food Technol.* 11 (1976) 515–523.
- [46] F. Ferreres, A. Ortiz, C. Silva, C. García-Viguera, F.A. Tomás-Barberán, F. Tomás-Lorente, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194 (1992) 139–143.
- [47] S. Sabatier, M.J. Amoít, M. Tacchini, S. Aubert, *J. Food Sci.* 57 (1992) 733–734.
- [48] F.A. Tomás-Barberán, F. Ferreres, C. García-Viguera, F. Tomás-Lorente, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196 (1993) 38–44.
- [49] F.A. Tomás-Barberán, C. García-Viguera, P. Vit-Olivier, F. Ferreres, F. Tomás-Lorente, *Phytochemistry* 34 (1993) 191–196.
- [50] F. Ferreres, M.A. Blázquez, M.I. Gil, F.A. Tomás-Barberán, *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 268–274.
- [51] F. Ferreres, C. García-Viguera, F. Tomás-Lorente, F.A. Tomás-Barberán, *J. Sci. Food Agric.* 61 (1993) 121–123.
- [52] F. Ferreres, J.M. Giner, F.A. Tomás-Barberán, *J. Sci. Food Agric.* 65 (1994) 371–372.
- [53] F. Ferreres, T. Juan, C. Perez-Arquillue, A. Herrera-Martache, C. García-Viguera, F.A. Tomás-Barberán, *J. Sci. Food Agric.* 77 (1998) 506–510.
- [54] F.A. Tomás-Barberán, I. Martos, F. Ferreres, B.S. Radovic, E. Anklam, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 485–496.
- [55] F. Ferreres, P. Andrade, M.I. Gil, F.A. Tomás-Barberán, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 202 (1996) 40–44.
- [56] F. Ferreres, P. Andrade, F.A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2053–2056.
- [57] The National Honey Board, 2003. 390 Lashley Street Longmont, <http://www.nhb.org/>.
- [58] M.J. Snow, M. Manley-Harris, *Food Chem.* 84 (2004) 145–147.
- [59] D. Tura, K. Robards, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 71–93.
- [60] F.A. Tomás-Barberán, M.A. Blázquez, C. García-Viguera, F. Ferreres, F. Tomás-Lorente, *Phytochem. Anal.* 3 (1992) 178–181.
- [61] F. Ferreres, P. Andrade, F.A. Tomás-Barberán, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199 (1994) 32–37.
- [62] M.I. Gil, F. Ferreres, A. Ortiz, E. Subra, F.A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2833–2838.
- [63] I. Martos, M. Cossentini, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2824–2829.
- [64] P. Vit, F.A. Tomás-Barberán, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 206 (1998) 288–293.
- [65] R.J. Weston, K.R. Mitchell, K.L. Allen, *Food Chem.* 64 (1999) 295–301.
- [66] I. Martos, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1498–1502.
- [67] I. Martos, F. Ferreres, L. Yao, B. D’Arcy, N. Caffin, F.A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4744–4748.
- [68] L. Yao, Y. Jiang, R. Singanusong, N. Datta, K. Raymont, *Food Chem.* 86 (2004) 169–177.
- [69] L. Yao, Y. Jiang, R. Singanusong, B. D’Arcy, N. Datta, N. Caffin, K. Raymont, *Food Res. Int.* 37 (2004) 166–174.
- [70] L. Yao, Y. Jiang, B. D’Arcy, R. Singanusong, N. Datta, N. Caffin, K. Raymont, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 210–214.
- [71] L. Yao, Y. Jiang, R. Singanusong, N. Datta, K. Raymont, *Food Res. Int.* 38 (2005) 651–658.
- [72] F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, M.I. Gil, F. Tomás-Lorente, *J. Sci. Food Agric.* 56 (1991) 49–56.
- [73] P. Andrade, F. Ferreres, M.I. Gil, F.A. Tomás-Barberán, *Food Chem.* 60 (1997) 79–84.
- [74] F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, C. Soler, *Apidologie* 25 (1994) 21–30.
- [75] A.M. Aljadi, M.Y. Kamaruddin, *Food Chem.* 85 (2004) 513–518.
- [76] A.M. Aljadi, K.M. Yusoff, *Turk. J. Med. Sci.* 33 (2003) 229–236.
- [77] H.A. Wahdan, *Infection* 26 (1998) 167–176.
- [78] P. Cabras, A. Angioni, C. Tuberoso, I. Froris, F. Reniero, C. Guillou, S. Ghelli, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4064–4067.

- [79] M. Al-Mamary, A. Al-Meer, M. Al-Habori, *Nutr. Res.* 22 (2002) 1041–1047.
- [80] G. Beretta, P. Granata, M. Ferrero, M. Orioli, R.M. Facino, *Anal. Chim. Acta* 533 (2005) 185–191.
- [81] A. Escarpa, M.C. González, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 119–127.
- [82] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Reventós, *Methods Enzymol.* 299 (1999) 152–178.
- [83] J.A. Vinson, J. Proch, P. Bose, *Methods Enzymol.* 335 (2001) 103–114.
- [84] T. Berahia, C. Cerrato, S. Sabatier, M.J. Amiot, *Sci. des aliments* 13 (1993) 15–24.
- [85] H. Long, Y.X. Zhu, P.T. Kissinger, *Chin. J. Anal. Chem.* 31 (2003) 631–634.
- [86] H. Long, Y.X. Zhu, L.A. Coury, C.T. Duda, C.B. Kissinger, P.T. Kissinger, *LC GC North Am. Suppl.* (2002) 61–64.
- [87] E. Jorg, G. Sontag, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 88 (1992) 179–183.
- [88] C. Delgado, F.A. Tomás-Barberán, T. Talou, A. Gaset, *Chromatographia* 38 (1994) 71–78.
- [89] E. Ghisalberti, *Bee World* 60 (1979) 59–84.
- [90] V. Bankova, S.L. De Castro, M.C. Marucci, *Apidologie* 31 (2000) 3–15.
- [91] M.C. Marcucci, *Apidologie* 26 (1995) 83–99.
- [92] G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 347–363.
- [93] H. Koo, P.L. Rosalen, J.A. Cury, Y.K. Park, M. Ikegaki, A. Sattler, *Caries Res.* 33 (1999) 393–400.
- [94] S. Castaldo, F. Capasso, *Fitoterapia* 73 (2002) S1–S6.
- [95] V. Bankova, *eCAM* 2 (2005) 29–32.
- [96] B. König, *Bee World* 66 (1985) 136–139.
- [97] J.W. Dobrowolski, S.B. Vohora, S.A. Kalpana, *J. Ethnopharmacol.* 35 (1991) 77–82.
- [98] B.H. Havsteen, *Pharmacol. Ther.* 96 (2002) 67–202.
- [99] H. Chi, A.K. Hsieh, C.L. Ng, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 593–597.
- [100] P.G. Pietta, C. Gordana, A.M. Pietta, *Fitoterapia* 73 (2002) S7–S20.
- [101] V. Bankova, R. Christov, G. Stoev, S. Popov, *J. Chromatogr.* 607 (1992) 150–153.
- [102] M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 608–612.
- [103] F.K. Abd El Hady, A.H. Hegazi, *Z. Naturforsch.* 57c (2002) 386–394.
- [104] A.G. Hegazi, F.K. Abd El Hady, *Z. Naturforsch.* 57c (2002) 395–402.
- [105] V. Bankova, M. Popova, S. Bogdanov, A.G. Sabatini, *Z. Naturforsch.* 57c (2002) 530–533.
- [106] M. Popova, V. Bankova, D. Butovska, V. Petkov, B. Nikolova-Damyanova, A.G. Sabatini, G.L. Marcuzzan, S. Bogdanov, *Phytochem. Anal.* 15 (2004) 235–240.
- [107] K. Salomão, A.P. Dantas, C.M. Borba, L.C. Campos, D.G. Machado, F.R. Aquino Neto, S.L. de Castro, *Lett. Appl. Microbiol.* 38 (2004) 87–92.
- [108] M. Popova, S. Silici, O. Kaftanoglu, V. Bankova, *Phytomedicine* 112 (2005) 221–228.
- [109] Y.K. Park, M.H. Koo, M. Ikegaki, J.L. Contado, *Arquivos Biol. Tecnol.* 40 (1997) 97–106.
- [110] Y.K. Park, M.H. Koo, J.A.S. Abreu, M. Ikegaki, J.A. Cury, P.L. Rosalen, *Curr. Microbiol.* 36 (1998) 24–28.
- [111] M.I.N. Moreno, M.I. Isla, A.R. Sampietro, M.A. Vattuone, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 109–114.
- [112] Y.K. Park, S.M. Alencar, C.L. Aguiar, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2502–2506.
- [113] F.A. Santos, E.M.A. Bastos, M. Uzeda, M.A.R. Carvalho, L.M. Farias, E.S.A. Moreira, F.C. Braga, *J. Ethnopharmacol.* 80 (2002) 1–7.
- [114] S.H. Fu, M.H. Yang, H.M. Wen, J.C. Chern, *J. Food Drug Anal.* 13 (1) (2005) 43–50.
- [115] K. Bosio, C. Avanzini, A. D’Avolio, O. Ozino, D. Savoia, *Lett. Appl. Microbiol.* 31 (2000) 174–177.
- [116] A.C.H.F. Sawaya, D.M. Tomazela, I.B.S. Cunha, V.S. Bankova, M.C. Marcucci, A.R. Custodio, M.N. Eberlin, *Analyst* 129 (2004) 739–744.
- [117] M.R. Ahn, S. Kumazawa, T. Hamasaka, K.S. Bang, T. Nakayama, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7286–7292.
- [118] R.G. Woisky, A. Salatino, *J. Apicult. Res.* 37 (1998) 99–105.
- [119] Y.K. Park, M. Ikegaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 2230–2232.
- [120] K. Mirodikawa, A.H. Banskota, Y. Tezuca, T. Nagaoka, K. Matsushige, D. Message, A.A.G. Huertas, S. Kadota, *Phytochem. Anal.* 12 (2001) 366–373.
- [121] Y.H. Cao, Y. Wang, Q. Yuan, *Chromatographia* 59 (2004) 135–140.
- [122] A.D. Pereira, M. Norsell, J.N. Cardoso, F.R.D. Neto, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5226–5230.
- [123] A.D. Pereira, A.C. Pinto, J.N. Cardoso, F.R.D. Neto, H.F.S. Ramos, G.M. Dellamora-Ortiz, E.P. dos Santos, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 396–400.
- [124] G. Negri, M.L.F. Salatino, A. Salatino, *J. Apic. Res.* 42 (4) (2003) 53–56.
- [125] N. Volpi, *Electrophoresis* 25 (2004) 1872–1878.
- [126] S. Kumazawa, T. Hamasaka, T. Nakayama, *Food Chem.* 84 (2004) 329–339.
- [127] J.S. Bonvehí, F.V. Coll, R.E. Jorda, *J. Am. Oil Chem.* 71 (1994) 529–532.
- [128] M. Nagy, D. Grancai, *Pharmazie* 51 (1996) 100–101.
- [129] C.C. Chang, M.H. Yang, H.M. Wen, J.C. Chern, *J. Food Drug Anal.* 10 (2002) 178–182.
- [130] P.G. Waterman, S. Mole, *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*, Blackwell Scientific, Cambridge, MA, 1994.
- [131] I. Jasprica, A. Smolcic-Bubalo, A. Mornar, M. Medic-Saric, *J. Planar Chromatogr.* 17 (2004) 95–101.
- [132] M. Medic-Saric, L. Jasprica, A. Smolcic-Bubalo, A. Mornar, *Croatica Chem. A* 77 (2004) 361–366.
- [133] M. Medic-Saric, L. Jasprica, A. Mornar, A. Smolcic-Bubalo, P. Golja, *J. Planar Chromatogr.* 17 (2004) 459–463.
- [134] V. Bankova, R. Christov, A. Kujumgiev, M.C. Marcucci, S. Popova, *Z. Naturforsch.* 50c (1995) 167–172.
- [135] K.R. Markham, K.A. Mitchell, A.L. Wilkins, J.A. Daldy, Y. Lu, *Phytochemistry* 42 (1996) 205–211.
- [136] M.C. Marcucci, J. Rodríguez, F. Ferreres, V. Bancova, R. Groto, S. Popov, *Z. Naturforsch.* 53c (1998) 117–119.
- [137] R. Christov, V. Bancova, A. Hegazi, F. Abd El Hady, S. Popov, *Z. Naturforsch.* 53c (1998) 197–200.
- [138] V. Bankova, R. Christov, C. Marcucci, S. Popov, *Z. Naturforsch.* 53c (1998) 402–406.
- [139] V. Bankova, G. Boudourova-Krasteva, S. Popov, J.M. Sforcin, S.R.C. Funari, *Apidologie* 29 (1998) 361–367.
- [140] W. Maciejewicz, T. Meresta, *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 41 (1999) 71–76.
- [141] J.D. Fontana, M. Passos, M.H.R. dos Santos, C.K. Fontana, B.H. Oliveira, L. Schause, R. Pontarolo, M.A. Barbirato, M.A. Ruggiero, F.M. Lancas, *Chromatographia* 52 (2000) 147–151.
- [142] A.G. Hegazi, F.K. Abd El Hady, F.A.M. Abd Allah, *Z. Naturforsch.* 55c (2000) 70–75.
- [143] W. Maciejewicz, M. Daniewski, K. Bal, W. Markowski, *Chromatographia* 53 (2001) 343–346.
- [144] W. Maciejewicz, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 24 (2001) 1171–1179.
- [145] N. Keskin, S. Hazir, K.H.C. Baser, M. Kurkuoglu, *Z. Naturforsch.* 56c (2001) 1112–1115.
- [146] W. Maciejewicz, M. Daniewski, T.H. Dzido, K. Bal, *Chem. Anal.* 47 (2002) 21–30.
- [147] G. Negri, M.L.F. Salatino, A. Salatino, *J. Apic. Res.* 42 (2003) 39–41.
- [148] A.D. Pereira, H.F.D. Ramos, E.S.C. Pocas, P.C.M. Dias, E.P. dos Santos, J.F.M. da Silva, J.N. Cardoso, F.R.D. Neto, *Z. Naturforsch.* 54c (1999) 395–400.
- [149] S. Kumazawa, H. Goto, T. Hamasaka, S. Fukumoto, T. Fujimoto, T. Nakayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 260–262.
- [150] R.B. Cole, *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*, John Wiley and Sons Inc., New York, 1997.
- [151] Y.K. Park, M.H. Koo, H.H. Sato, J.L. Contado, *Arquivos Biol. Technol.* 38 (1995) 1253–1259.
- [152] P. Menghinello, L. Cucchiari, F. Palma, D. Agostini, M. Dacha, V. Stocchi, *Arquivos Biol. Technol.* 22 (1999) 3007–3018.

- [153] M.C. Marcucci, F. Ferreres, A.R. Custodio, M.M.C. Ferreira, V.S. Bankova, C. Garcia-Viguera, W.A. Bretz, *Z. Naturforsch.* 55c (2000) 76–81.
- [154] A.D. Pereira, A.F.D. Pereira, L.C. Trugo, F.R.D. Neto, *Z. Naturforsch.* 58c (2003) 590–593.
- [155] M.L. Bruschi, S.L. Franco, M.P.D. Gremiao, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 26 (2003) 2399–2409.
- [156] I.B.D.S. Cunha, K. Salomao, M. Shimizu, V.S. Bankova, A.R. Custodio, S.L. de Castro, M.C. Marcucci, *Chem. Pharma. Bull.* 52 (2004) 602–604.
- [157] T. Hamasaka, S. Kumazawa, T.F. Fujimoto, T. Nakayama, *Food Sci. Tech. Res.* 10 (1) (2004) 86–92.
- [158] Y. Lu, C. Wu, Z. Yuan, *Fitoterapia* 75 (2004) 267–276.

CAPÍTULO 3

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN PROPÓLEO MEDIANTE CE-ESI-MS

Para llevar a cabo el estudio de los compuestos fenólicos en propóleo se han desarrollado numerosos métodos analíticos (incluyendo métodos espectrofotométricos, cromatográficos y electroforéticos). No obstante, ha sido bastante limitado el número de trabajos realizados empleando CE, como técnica de separación, acoplada a un espectrómetro de masas, como sistema de detección.



Figura 3.1. Abejas recolectando partículas resinosas; propóleo en la colmena y una vez recogido

En este capítulo se quiere poner de manifiesto la potencialidad del acoplamiento CE-ESI-MS para llevar a cabo la identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios que contiene una muestra de propóleo. Se seleccionó la CZE como modalidad de la CE más adecuada para alcanzar dicho objetivo y se optimizaron tanto los parámetros que afectan a la separación electroforética (pH, concentración y presencia de aditivos en el buffer de separación, voltaje y tiempo de inyección), como los que afectan a la intensidad de la señal en el espectrómetro de masas con analizador IT (composición y flujo del líquido adicional; temperatura y flujo del gas de secado; presión del gas de nebulización y el parámetro “estabilidad del compuesto”). El desarrollo del método se llevó a cabo en el equipo que se muestra en la **figura 3.2**.

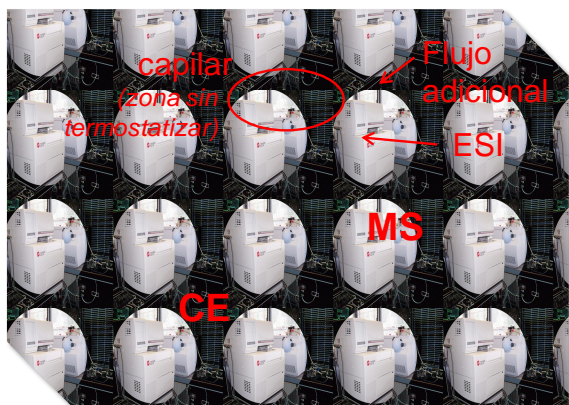


Figura 3.2. Sistema CE-ESI- IT usado en el desarrollo del método para la identificación de compuestos fenólicos en propóleo

Para la extracción de los compuestos fenólicos del propóleo se utilizó etanol al 70% como disolvente. Empleando el método optimizado se identificaron tentativamente doce flavonoides. El uso de otro espectrómetro de masas, con analizador TOF, permitió corroborar la identificación de dichos compuestos comparando las fórmulas moleculares, generadas a partir de los datos de masa exacta y de distribución isotópica, con los datos disponibles en bibliografía.

Los compuestos fenólicos son en gran parte responsables de la mayoría de las propiedades farmacológicas del propóleo. La actividad biológica de los compuestos identificados en la muestra analizada ha sido ya descrita^{150,151}. Así:

- ✓ El *kaempferol* es espasmolítico.
- ✓ La *luteolina* es antiviral (ejerce efecto inhibitor frente al virus del herpes) y ayuda a cicatrizar las úlceras gástricas.
- ✓ El *3-acetato de pinobanksina* es antimicrobiano, antibacteriano y fungicida.
- ✓ La *naringenina* ejerce efectos antiinflamatorios.
- ✓ La *pinocembrina* es de los flavonoides con mayor actividad, es bactericida, fungicida (inhibe el desarrollo de los hongos *Candida* y *Blastomyces*), antiulcerosa, antimicrobiana tanto *in vitro* como en uso externo y anestésico local.
- ✓ La *chrysin* es antitumoral y anti-*Helicobacter pylori* (bacteria responsable de muchas úlceras y gastritis).
- ✓ La *daidzeina*, al igual que otras isoflavonas, tiene actividad estrogénica además de ser anticancerígena y beneficiosa en caso de osteoporosis y de enfermedades cardiovasculares.
- ✓ La *quercetina 3,7-dimetil éter* tiene una fuerte actividad antioxidante y es vasorelajante.

¹⁵⁰ Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A., *El propolis y la salud humana*, Ars. Pharmaceutica 2004, 45, 21-43.

¹⁵¹ Stangaciu, S., *A guide to the composition and properties of propolis*, Apiacta, 1998, 33, 71-77.

- ✓ La *galangina* es capaz de inhibir el desarrollo de las bacterias (anti-*Helicobacter pylori*), también tiene efectos fungicidas, antimicrobianos y antiinflamatorios.
- ✓ La *apigenina* es antiulcerosa y antiviral.
- ✓ La *kaempferida* ejerce efecto sobre los microorganismos resistentes a ácidos (anti-*Mycobacterium phlei*) y es espasmolítica.

Los extractos etanólicos del propóleo, además de ser una fuente natural de antioxidantes, poseen una acción anestésica local (debido a la pinocembrina, entre otros) y son activos en la periodontitis bacteriana, probablemente gracias al efecto sinérgico de varios de sus compuestos.

Como ya se ha mencionado, la composición exacta del propóleo depende de las especies florales presentes en la zona donde las abejas realizan la recolección y, por tanto, de las características geográficas y climáticas de dicha zona. El propóleo puede clasificarse en función de su origen geográfico y, aunque los datos relativos al contenido de compuestos fenólicos son incompletos, se sabe que los propóleos del género *Populus* spp. (álamo) contienen una mezcla de agliconas flavónicas, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres, que la variedad rusa contiene básicamente agliconas flavónicas, y la brasileña derivados carbono-prenilados del ácido *p*-coumárico (**tabla 3.1**)¹⁵².

Tabla 3.1. Compuestos característicos del propóleo de diferentes orígenes geográficos

Origen geográfico	Planta principal de la que proviene	Constituyentes típicos (compuestos principales)
Europa, Asia, Norteamérica	<i>Populus</i> spp. (álamo)	Pinocembrina, pinobanksina, 3-acetato de pinobanksina, crisina, galangina, cafeatos (bencil, prenil, feniletill)
Norte de Rusia	<i>Betula verrucosa</i> (abedul)	Acacetina, apigenina, ermanina, rhamnicitrina, kaempferida, α -acetoxibetuleol
Brasil	<i>Baccharis</i> spp. <i>Araucaria</i> spp. (confiera)	Prenilados del ácido <i>p</i> -coumárico y de las acetofenonas, ácidos diterpénicos
Islas Canarias	Desconocido	Lignanos furorunanos

La muestra de propóleo analizada en este trabajo contiene, entre otros, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y crisina, compuestos típicos de los propóleos europeos procedentes mayoritariamente de las resinas de los álamos.

¹⁵² Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marccici, M.C., *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*, *Apidologie*, 2000, 31, 3-15.

Este trabajo se ha publicado en la revista *Journal of Separation Science* bajo el título “***Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis-mass spectrometry***”.

María Gómez-Romero¹
 David Arráez-Román¹
 Rosario Moreno-Torres²
 Patricia García-Salas²
 Antonio Segura-Carretero¹
 Alberto Fernández-Gutiérrez¹

Original Paper

Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis–mass spectrometry

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

²Verbiotech I+D+i S.L. Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla, Granada, Spain

Propolis is a resinous hive product rich in antioxidant compounds. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometric detection can provide selective information about the analytes present in complex extracts of propolis and has turned out to be an attractive alternative to HPLC methods. Therefore, a CE-ESI-MS method has been developed for the analysis of antioxidant compounds obtained from propolis. For this purpose, different electrophoretic parameters such as the nature, pH, and concentration of the separation buffer, as well as electrospray parameters (dry gas temperature and flow, nebulising gas pressure, and make-up flow) have been carefully optimised. Different phenolic compounds (*e.g.* pinobanksin 3-acetate, naringenin, pinocembrin, chrysin, daidzein, quercetin 3',7-dimethyl ether, apigenin, and kaempferid) could be detected. To confirm the identity of the phenolic compounds in propolis extracts, accurate mass data of the molecular ions were obtained by TOF MS. Limits of detection ranging from 6 mg/100 g of raw propolis for chrysin to 58 mg/100 g of raw propolis for luteolin, were obtained.

Keywords: Antioxidants / Capillary electrophoresis / Mass spectrometry / Propolis

Received: September 9, 2006; revised: November 10, 2006; accepted: December 18, 2006

DOI 10.1002/jssc.200600354

1 Introduction

Propolis, or bee glue, is a resinous hive product collected by honeybees from leaf buds and cracks in the bark of various plant sources; it comprises plant exudates, substances secreted in the course of bee metabolism, and materials which are introduced during propolis elaboration [1]. The precise composition of raw propolis is extremely complex and depends on the species of local flora present at the site of collection and thus on the geographic and climatic characteristics of the site [2]. In general, it is made up of 50% resin and vegetable balsam, 30% wax, 10% essential and aromatic oils, 5% pollen, and 5% other compounds [3].

The word propolis is of Greek origin, stemming from *pro*, in front of, *e.g.*, at the entrance to, and *polis*, city or community. The name thus implies a product involved in the defence of the bee community. Bees apply propolis

as a thin layer on the internal walls of their hive or other cavity that they inhabit. It is used to seal holes, strengthen the thin borders of the comb, exclude draughts, and make the entrance of the hive weather-proof or easier to defend. Propolis is also used as an “embalming” substance to cover hive invaders which bees have killed but cannot transport out of the hive [4].

An essential characteristic of propolis is its action against micro-organisms and it has been used since ancient times for its pharmaceutical properties. Propolis possesses antibacterial, antifungal, and antiviral properties and many other beneficial biological activities: antioxidative, anti-inflammatory, local anaesthetic, antiseptic, antiulcer, antitumor, hepatoprotective, *etc.* [1, 4, 5]. For this reason it is used extensively as a popular remedy in folk medicine, in apitherapy, as a constituent of “biocosmetics”, “health foods” [6], and for numerous other purposes.

This biological activity is mainly due to the presence of bioactive constituents such as flavonoids, phenolic acids and their esters [1, 7]. The characterisation of these antioxidants from propolis has been successfully carried out by GC [8–10] and HPLC [11–16]. Due to its various advantages, such as the rapidity of the method, the small amounts of sample required, and an extremely low level of solvent waste, CE has gained widespread interest as a favourable technique for the analysis of antioxidants. It

Correspondence: Dr. Antonio Segura-Carretero/Dr. Alberto Fernández-Gutiérrez, Research group FQM-297, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: ansegura@ugr.es (Dr. Antonio Segura-Carretero); albertof@ugr.es (Dr. Alberto Fernández-Gutiérrez)
Fax: +34 9 58249510

Abbreviations: BPE, base peak electropherogram; EIE, extract ion electropherogram; TEA, triethylamine

has become an alternative or complement to chromatographic separations for the analysis of propolis compounds because it needs no derivatisation step, requires only small amounts of sample and buffer, and has proved to be a high-resolution technique [17–22]. The utility of CE is greatly enhanced by mass spectrometric detection (CE–MS) and, particularly, electrospray ionisation mass spectrometry (CE–ESI–MS). This soft-ionisation technique allows the generation of ions even from thermally labile, non-volatile, polar compounds, such as natural antioxidants. Moreover, MS provides the sensitivity and detectability required for CE working conditions, in addition to compound identification capability, all of which make CE–ESI–MS one of the most powerful analytical techniques available. CE–ESI–MS procedures have already been developed for the analysis of antioxidant compounds in different samples [23–28].

The goal of this work is the development of a rapid and simple CE–ESI–MS method for the determination of major antioxidant compounds in propolis extracts. All the CE–ESI–MS parameters were studied with an emphasis on obtaining the best selectivity and sensitivity. Identification of the compounds was carried out with the aid of TOF MS.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade and used as received. Ammonium acetate, from Panreac (Barcelona, Spain), and ammonia, from Merck (Darmstadt, Germany), were used to prepare CE running buffers of different concentrations and pH values. Buffers were prepared by weighing the appropriate amount of ammonium acetate corresponding to the concentrations indicated and adding ammonia (2 M) to adjust the pH. The buffers were prepared with doubly deionised water, stored at 4°C, and brought to room temperature before use.

Doubly deionised water was obtained with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA). Triethylamine was from Aldrich (Steinheim, Germany); sodium hydroxide, 2-propanol used in the sheath flow and in the buffer, and ethanol used in the extraction procedure, all of HPLC grade, were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). All solutions were filtered through a 0.45- μm Millipore (Bedford, MA, USA) membrane filter before injection into the capillary.

All phenolic standards (luteolin, kaempferol, naringenin, pinocembrin, chrysin, daidzein, galangin, apigenin, and kaempferid) were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). See Fig. 1 for the species in propolis extracts identified by means of CE–MS.

2.2 Extraction and preparation of samples

Propolis samples were supplied by Verbiotech, I+D+i, S.L. (Granada, Spain).

Different extraction procedures have been tested, varying the quantity and type of organic solvent and the extraction time [29]. However, the better extraction system was the following.

Propolis, grated after cooling, was extracted for 24 h with 70% ethanol (in a proportion of 1:10, w/v) with agitation at room temperature [30]. The extract was then filtered through a paper filter supplied in reams (73 g/m²) and later through a 0.45- μm membrane filter. Samples were stored in the dark at 4°C. The ethanolic preparations were diluted in 70% ethanol (1:1) and directly used for the CE–ESI–MS analysis.

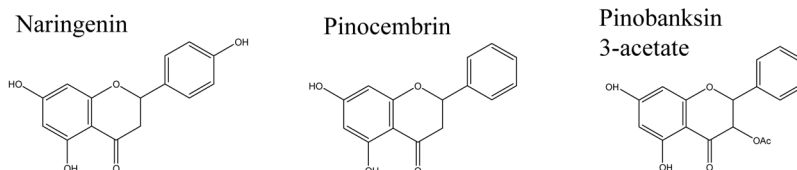
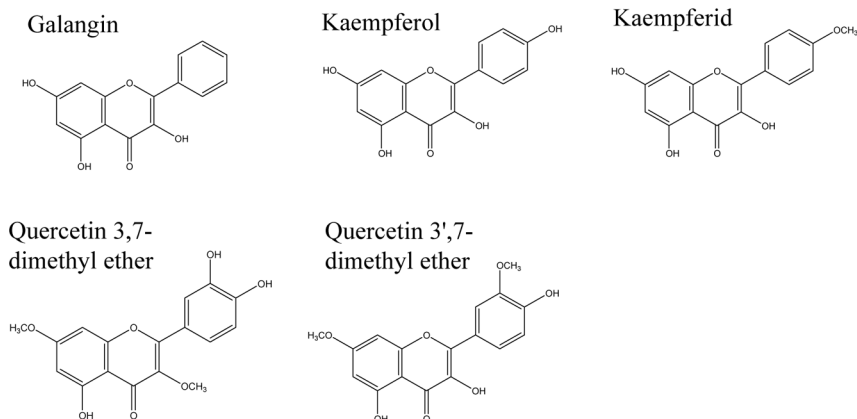
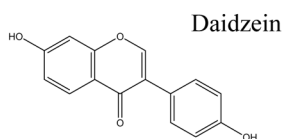
2.3 Capillary electrophoresis

Analyses were performed in a P/ACE System MDQ (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). The CE apparatus was equipped with an UV-Vis detector working at 214 nm and coupled to the MS detector by an orthogonal electrospray interface (ESI). The CE instrument was controlled by a PC running 32 Karat System software from Beckman. A commercial coaxial sheath-flow interface was used (see below). The bare fused-silica capillary of 50 μm id came from Beckman Coulter Inc. (Fullerton, CA, USA). The total length was 90 cm (corresponding to the MS detection length).

Before first use, the bare capillaries were conditioned with 0.1 M sodium hydroxide during 20 min followed by a water rinse for another 10 min. At the end of the day the capillary was flushed with water for 10 min. Between runs, the capillary was flushed with 0.1 M sodium hydroxide, water, and separation buffer for 3, 2, and 5 min, respectively (all rinses during capillary conditioning were done using N₂ at a pressure of 20 psi; 1 psi = 6894.76 Pa).

2.4 Mass spectrometry

A Bruker Daltonics Esquire 2000 mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray interface (model G1607A from Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was normally used for the analysis. Electrical contact at the electrospray needle tip was established via a sheath liquid by a 74900-00-05 Cole Palmer syringe pump (Vernon Hills, Illinois, USA). For the connection between the CE system and the electrospray ion source of the mass spectrometer, the outlet of the separation capillary was fitted into the electrospray needle of the ion source and a flow of conductive sheath liquid established electrical contact between capillary effluent and water for the electrospray

FLAVONES**FLAVANONES****FLAVONOLS****ISOFLAVONES****Figure 1.** Structures of the flavonoids identified.

needle. The mass spectrometer was run in the negative ion mode and the capillary voltage was set at 4000 V. The ion trap scanned the 100–800 m/z range at 13000 u/s during the separation and detection. The maximum accumulation time for the ion trap was set at 5.00 ms, the target count at 20000, and the trap drive level at 100%. Electrospray operating conditions were optimised as described in Section 3. The instrument was controlled by a PC running Esquire NT software from Bruker Daltonics.

Identification of the compounds was performed using a microTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), an orthogonal-accelerated TOF mass spectrometer (oaTOF-MS).

The accurate mass data of the molecular ions were processed by DataAnalysis 3.3 software (Bruker Daltonik GmbH). It provided a list of possible elemental formulae by means of the GenerateMolecularFormula editor, which uses a CHNO algorithm. Since analyzed polyphenols do not contain nitrogen it was eliminated in the

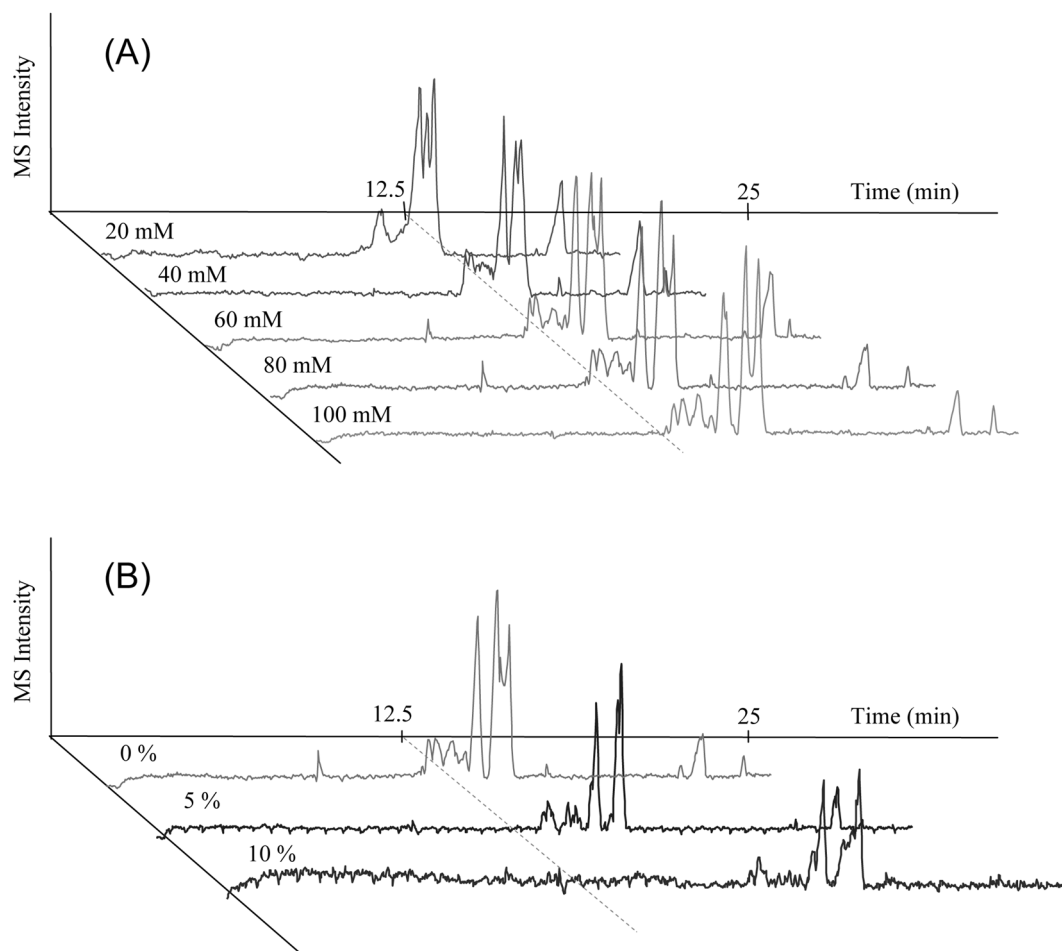


Figure 2. Optimisation of the buffer composition. BPE (50–800 m/z) at different ammonium acetate concentrations (A) and the addition of different concentrations of 2-propanol (B).

algorithm before generating the formula. The formulae found were listed with corresponding information such as, *e.g.*, elemental composition, sigma, and m/z values [31]. The calibration of the spectra was internal. It was performed using a sodium formate cluster by switching the sheath liquid to a solution containing 5 mM sodium hydroxide in the sheath liquid of 0.2% formic acid in water/isopropanol 1:1 v/v.

3 Results and discussion

3.1 Development of CE–ESI-MS method

The CE–ESI-MS method was developed directly using the propolis extract. The CE conditions were initially optimised to match the MS conditions in order to obtain the best resolution, sensitivity, analysis time, and peak shape.

Successful coupling between CE and MS is governed mainly by the volatility requirements of the CE running

buffer. The buffers most commonly used for a conventional electrophoretic method, such as borate and phosphate buffers and other additives like SDS, are not suitable for CE coupling with ESI-MS because of their non-volatility and the risk of MS source contamination. Other buffers, such as formic acid, acetic acid, ammonium carbonate, and ammonium acetate prove to be compatible with a CE–MS interface and/or with an MS instrument [32].

Initially, the conditions tested were type, concentration and pH of buffer, and voltage. First, different buffers compatible with CE–ESI-MS were studied (40 mM ammonium acetate and ammonium carbonate at pH 9) and the best resolution and peak shape were obtained using ammonium acetate. Its concentration was varied between 20 and 100 mM (in steps of 20 mM) (Fig. 2A shows the base peak electropherogram, BPE, at the different concentrations). The best resolution was found with concentrations of 80 mM. Increasing the ammonium acetate concentration resulted in a significant Joule

effect and, as a part of the capillary is not thermostated, led to irreproducibility in the migration time. The addition of 2-propanol as organic modifier in the range of 0–10% was then tested [25]. A higher signal response with smaller signal-to-noise ratio and minimum analysis time was found without 2-propanol (Fig. 2B). Using 80 mM ammonium acetate without 2-propanol, the effect of different pH values from 8 to 11, adjusted in steps of 0.5 pH units by addition of ammonia solution, was studied. Under such basic conditions, the polyphenols can acquire a negative charge that could favour their separation by CE. A pH value of 10.5 was selected as optimum giving the best peak shape. The applied voltage was varied between 10–30 kV and a voltage of 30 kV was selected to provide the best resolution and short analysis time. The injections were performed at the anodic end using an N₂ pressure of 0.5 psi for 3 s. In view of the large number of compounds in the propolis matrix, this work has focused on the determination and characterisation of the main compounds. That is the reason for choosing this short injection time.

The ESI-MS parameters were optimised in order to obtain the highest signal intensity and adequate MS signals. This optimisation was carried out using a univariate method and the output parameter was the sum of the peak intensities of five compounds from the propolis extract. The parameters to be optimised were sheath liquid composition and flow rate, drying gas flow rate and temperature, and nebulisation gas pressure.

The coaxial sheath liquid is required to increase the actual flow rate from the capillary and it also allows closing of the CE electrical circuit. It is well known that the choice of the sheath liquid and its flow rate has a significant effect on the sensitivity and electrical contact between CE and ESI [33, 34]. A high content of organic solvent in the sheath liquid has been reported to improve the efficiency of ionic evaporation [35]. Therefore, we optimised this by varying the composition (methanol/water and 2-propanol/water) and the percentage of organic solvent between 40 and 80%. With 2-propanol as organic solvent a better response was obtained than with methanol. Therefore, five different percentage contents of 2-propanol were tested: 2-propanol/water 40:60 v/v, 2-propanol/water 50:50 v/v, 2-propanol/water 60:40 v/v, 2-propanol/water 70:30 v/v, and 2-propanol/water 80:20 v/v. The highest signal was obtained with an 80:20 sheath liquid. Higher percentages were checked but caused poor electrical contact between CE and ESI and the current broke down. Generally, small amounts of volatile TEA (triethylamine) or ammonium hydroxide can be used to improve ionisation for ESI-negative detection [36]. For that reason 0.1% (v/v) TEA was added and led to a better sensitivity. Finally, an 80:20 sheath liquid with 0.1% (v/v) TEA was chosen as giving the highest signal and an appropriate current stability. The make-up flow rate was

studied in the range from 2.9 to 5.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. While higher flow rates result in a lower signal-to-noise ratio, due to the dilution of the separated compounds, lower flow rates produce instability of the spray. Finally, an intermediate flow rate of 4.6 $\mu\text{L}/\text{min}$ was selected as optimum in terms of signal response and stability.

The drying gas in ESI affects the stability and intensity of the signal; it can accelerate buffer desolvation and increase sensitivity [37]. The drying gas flow was tested in the range from 2 to 8 L/min, with 4 L/min being chosen as the optimum value (Fig. 3A). In Fig. 2, MS intensity corresponds to the sum of the peak intensity of five different ions (m/z 313, 255, 271, 299, 327). The drying gas temperature was varied between 100 and 300°C, and 200°C was found to give a good MS signal (Fig. 3B).

The choice of nebulisation gas is a compromise between maintaining an efficient electrophoretic separation and improving the ionisation performance [35, 37, 38]. This parameter was tested in the range from 2 to 10 psi. Increasing nebulisation gas velocity caused an undesirable hydrodynamic flow inside the capillary, the migration times were lower, and the resolution decreased, whereas decreasing the pressure of the nebulisation gas improved the sensitivity and the resolution between the studied compounds; thus a pressure of 4 psi was chosen as an optimum parameter (Fig. 3C).

Finally, the compound stability was optimised. For a low stability of compounds the number of molecules transferred into the MS analyzer was extremely low. On the other hand, if the compounds are considered 100% stable, a higher electric field is used in the capillary skimmer to force entrance of the ions and some of the compounds become unstable. The optimum was found for a compound stability percentage of 50% (Fig. 3D).

As a result, the following CE-ESI-MS conditions were finally selected: running buffer 80 mM ammonium acetate/ammonia, pH 10.5, voltage 30 kV, 3 s injection time, sheath liquid 2-propanol/water 80:20 with 0.1% (v/v) TEA delivered at a flow rate of 4.6 $\mu\text{L}/\text{min}$, a drying gas flow rate of 4 L/min at 200°C, and a nebulising gas pressure of 4 psi. MS analyses were carried out using a compound stability of 50%.

Under these conditions, CE-ESI-MS records such as the one depicted in Fig. 4 were obtained for the propolis extract.

Repeatability of the CE-ESI-MS analysis was studied by performing series of separations using the optimised method by analysis of ethanol-water extracts on the same day (intraday precision, $n = 5$) and on three consecutive days (interday precision, $n = 15$). The relative standard deviations (RSDs) of analysis time and peak area were determined. The intraday repeatability of the analysis time (expressed as RSD) was 0.19%, whilst the interday repeatability was 0.75%. The intraday repeatability of the peak area (expressed as RSD) was 5.5%, whilst the

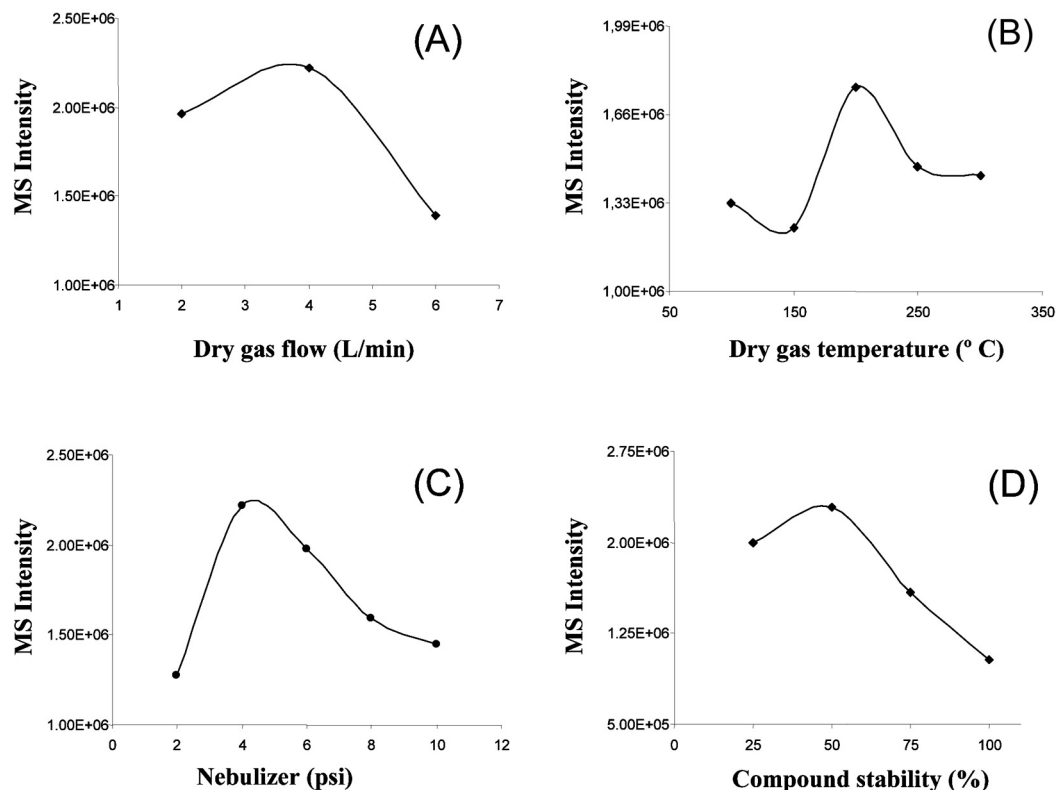


Figure 3. Optimisation of ESI–MS parameters: dry gas flow (A), dry gas temperature (B), nebuliser gas pressure (C) and compound stability (D). MS intensity corresponds to the sum of the peak intensity of five different ions (m/z 313, 255, 271, 299, 327). Initial conditions: 50 μm id fused silica capillary, 90 cm total length. Buffer: 80 mM ammonium acetate pH 10.5, voltage: 30 kV, injection time: 3 s at 0.5 psi. Sheath liquid: 2-propanol/water 60:40 v/v and 0.1% v/v of triethylamine at flow rate 4 $\mu\text{L}/\text{min}$. MS analyses were carried out using negative polarity. MS scan 100–800 m/z (target mass 450 m/z). Sample: Propolis extract.

interday repeatability was 7.9%, which is adequate for the aim of this work.

3.2 Identification of polyphenolic compounds in propolis

Figure 4 shows the BPE and the extract ion electropherogram (EIE) for all the main ions found in the propolis extract. The peaks of the main polyphenolic ions of the propolis extract were identified by comparing both migration times and MS data obtained from propolis samples with standards and using accurate mass values.

TOF MS analysis is generally used for rapid and accurate identification of molecular weights. The technique was applied in this study to confirm the identification of the phenolic compounds in the propolis extracts. These compounds are summarised in Table 1, including m/z experimental, selected ion, search tolerance (ppm), a list of possibilities, the error and the sigma value (comparison of the theoretical with the measured isotope pattern). The compounds identified are in italics and bold-face print in the list of possibilities of the molecular for-

mulas generated. These compounds are: (5) kaempferol ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 285.0405 m/z), (6) luteolin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 285.0405 m/z), (9) pinobanksin 3-acetate ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 313.0718 m/z), (10) naringenin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 271.0612 m/z), (11) pinocembrin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 255.0663 m/z), (12) chrysin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 253.0506 m/z), (13) or daidzein ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 253.0506 m/z), (14) quercetin 3',7-dimethyl ether or quercetin 3,7-dimethyl ether ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 329.0667 m/z), (15) galangin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 269.0455 m/z), (16) apigenin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 269.0455 m/z), (17) kaempferid ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 299.0561 m/z).

The compounds (5) kaempferol, (6) luteolin, and (15) galangin have been previously reported in several publications about propolis analysis [39, 40]. Nevertheless, due to the high sigma and error values that these compounds present in this work, we cannot assure that they are in the propolis extract.

As has been reported in previous papers, phenolic compound analysis, predominantly by HPLC, has been used in the identification of propolis compounds [41, 42] and the results employed as a tool for studying the floral and geographical origins of propolis [29]. In addition, pinocembrin and chrysin ($[\text{M}-\text{H}]^-$ 255.0588, 253.0453 m/z

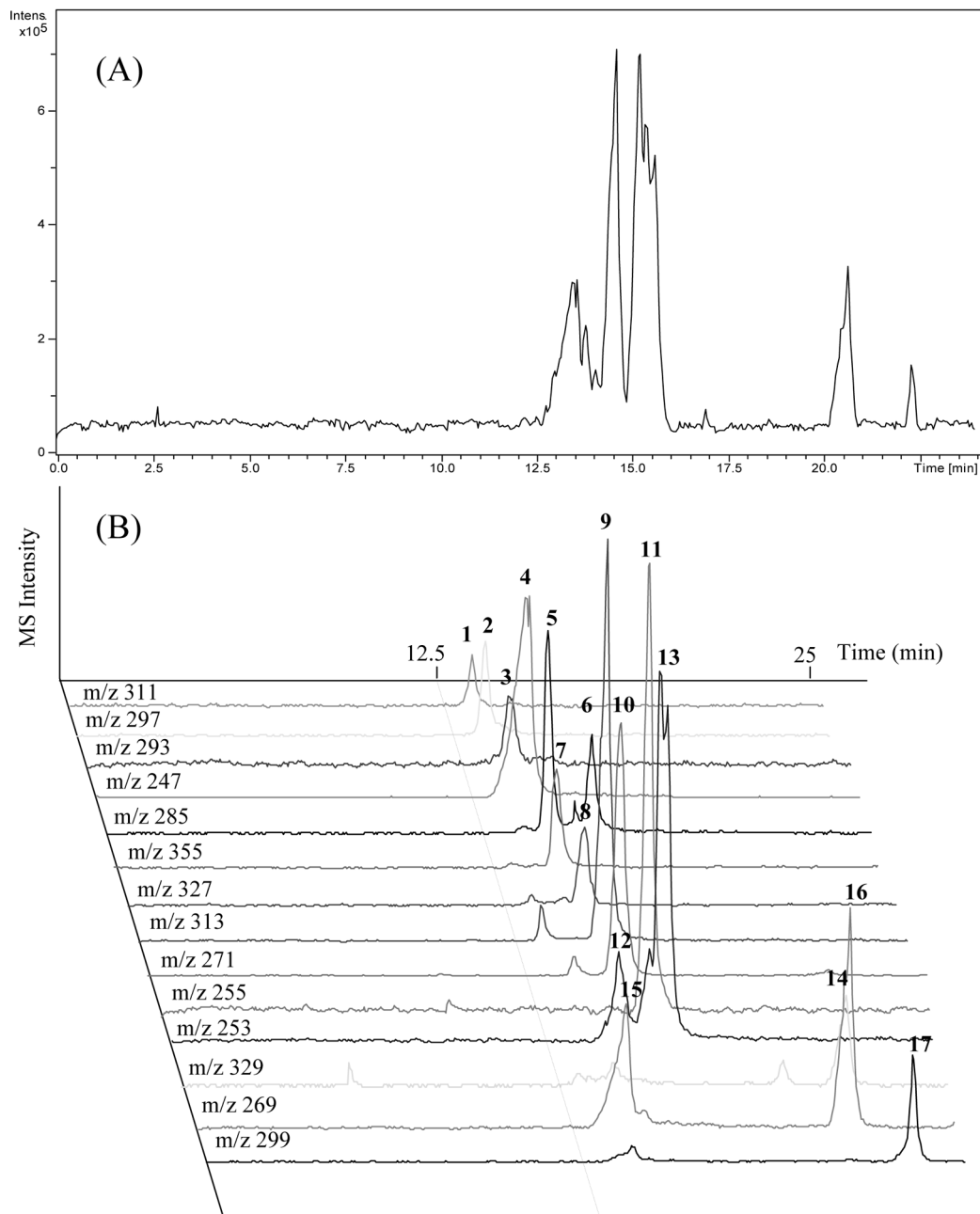


Figure 4. Base peak electropherogram (BPE) of propolis sample using the optimal conditions (A) and extracted ion electropherogram (EIE) of the detected compounds (B). (1) N.I., (2) N.I., (3) N.I., (4) N.I., (5) luteolin, (6) kaempferol, (7) N.I., (8) N.I., (9) pinobanksin 3-acetate, (10) naringenin, (11) pinocembrin, (12) chrysin, (13) daidzein, (14) quercetin 3',7-dimethyl ether or quercetin 3,7-dimethyl ether, (15) galangin, (16) apigenin, (17) kaempferid. N.I.: Not identified. CE–MS conditions: Buffer: 80 mM ammonium acetate at pH 10.5. Voltage: 30 kV. Injection time: 3 s at 0.5 psi. Sheath liquid: 2-propanol/water 80:20 (v/v) containing 0.1% (v/v) triethylamine, flow rate 4.6 μ L/min. Drying gas: 4 L/min, 200°C. Nebulising gas pressure 4 psi. MS analyses were carried out using negative polarity. Compound stability: 50%. MS scan 100–800 m/z (target mass 450 m/z). Sample: Propolis extract.

respectively) are the characteristic flavonoids of propolis, and these flavonoid compounds have been found in most European honey samples [43].

In our research, some ions of the EIE show two peaks that have been identified using the migration time and

the bibliography. The EIE with $[M-H]^-$ 329.0564 m/z shows one peak that could correspond to two different compounds such as quercetin 3',7-dimethyl ether and quercetin 3,7-dimethyl ether for which no standards exist; however, they have been found in propolis [39].

Table 1. Compounds detected by TOF-MS in the propolis extract.

Peak	<i>m/z</i> experimental	Selected ion	Tolerance (ppm) in generated molecular formula	List of possibilities in generated molecular formula (in increasing order of sigma)	Possible compounds ^{a)}	<i>m/z</i> calculated ^{b)}	Sigma value ^{b)}	Error (ppm) ^{b)}
1	311.2113	[M-H] ⁻	25	C ₁₄ H ₃₁ O ₇	–	311.2075	0.0443	-12.211
2	297.2367	[M-H] ⁻	25	C ₁₄ H ₃₃ O ₆	–	297.2435	0.0425	22.877
3	293.2035	[M-H] ⁻	30	C ₁₄ H ₂₉ O ₆	–	293.2122	0.1909	29.671
4	247.0937	[M-H] ⁻	25	C ₁₄ H ₁₅ O ₄	–	247.0976	0.0739	15.783
5	285.0681	[M-H] ⁻	100	C ₁₆ H ₁₃ O ₅ , C ₁₂ H ₁₃ O ₈ , C ₁₉ H ₉ O ₃ , C ₂₀ H ₁₃ O ₂ , C₁₅H₉O₆ , C ₈ H ₁₃ O ₁₁	<i>Kaempferol</i>	285.0405	0.7552	-96.828
6	285.0660	[M-H] ⁻	100	C ₁₆ H ₁₃ O ₅ , C ₁₉ H ₉ O ₃ , C ₁₂ H ₁₃ O ₈ , C ₉ H ₁₇ O ₁₀ , C ₈ H ₁₃ O ₁₁ , C₁₅H₉O₆	<i>Luteolin</i>	285.0405	0.7552	-89.461
7	355.1170	[M-H] ⁻	25	C ₂₀ H ₁₉ O ₆ , C ₂₇ H ₁₅ O ₁ , C ₁₃ H ₂₃ O ₁₁ , C ₉ H ₂₃ O ₁₄	–	355.1187	0.0066	4.787
8	327.0806	[M-H] ⁻	25	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ , C ₂₅ H ₁₁ O ₁ , C ₇ H ₁₉ O ₁₄	–	327.0874	0.0382	20.790
9	313.0703	[M-H] ⁻	5	C₁₇H₁₃O₆	<i>Pinobanksin 3-acetate</i>	313.0718	0.0009	4.791
10	271.0614	[M-H] ⁻	5	C₁₅H₁₁O₅	<i>Naringenin</i>	271.0612	0.0192	-0.738
11	255.0676	[M-H] ⁻	5	C₁₅H₁₁O₄	<i>Pinocembrin</i>	255.0663	0.0076	-4.705
12	253.0514	[M-H] ⁻	5	C₁₅H₉O₄	<i>Chrysin</i>	253.0506	0.0509	-3.119
13	253.0524	[M-H] ⁻	5	C₁₅H₉O₄	<i>Daidzein</i>	253.0506	0.0190	-4.940
14	329.0651	[M-H] ⁻	5	C₁₇H₁₃O₇ , C ₂₄ H ₉ O ₂ , C ₆ H ₁₇ O ₁₅	<i>Quercetin 3,7-dimethyl ether or quercetin 3',7-dimethyl ether</i>	329.0667	0.0066	4.862
15	269.0724	[M-H] ⁻	100	C ₁₆ H ₁₃ O ₄ , C ₁₉ H ₉ O ₂ , C ₁₂ H ₁₃ O ₇ , C ₈ H ₁₃ O ₁₀ , C₁₅H₉O₅ , C ₂₀ H ₁₃ O ₁	<i>Galangin</i>	269.0455	0.8128	-99.922
16	269.0468	[M-H] ⁻	5	C₁₅H₉O₅ , C ₈ H ₁₃ O ₁₀	<i>Apigenin</i>	269.0455	0.0130	-4.832
17	299.0547	[M-H] ⁻	5	C₁₆H₁₁O₆ , C ₁₂ H ₁₁ O ₉ , C ₂₃ H ₇ O ₁ , C ₅ H ₁₅ O ₁₄	<i>Kaempferid</i>	299.0561	0.0073	4.681

^{a)} The possible compound given corresponds to the molecular formula generated which is written in bold and italics.

^{b)} These values correspond to the possible compound given. If no compound is given, these values correspond to the first molecular formula in the list of possibilities.

In order to evaluate the sensitivity of the optimised method, the limits of detection were calculated by using a signal-to-noise ratio of 3. A wide range of detection limits were found for the phenolic compounds identified, ranging from 6 mg/100 g of raw propolis for chrysin to 58 mg/100 g of raw propolis for luteolin.

4 Concluding remarks

The combination of CE and MS seems to be an attractive method for the determination and characterisation of antioxidant compounds in propolis samples and constitutes an alternative approach to obtain typical fingerprints of propolis. To our knowledge, the present work describes the first CE-ESI-MS method for propolis analysis. The reported results demonstrate the utility of this hyphenated technique for the analysis of the most relevant components of complex matrices such as propolis. Additionally, TOF MS provides excellent mass accuracy

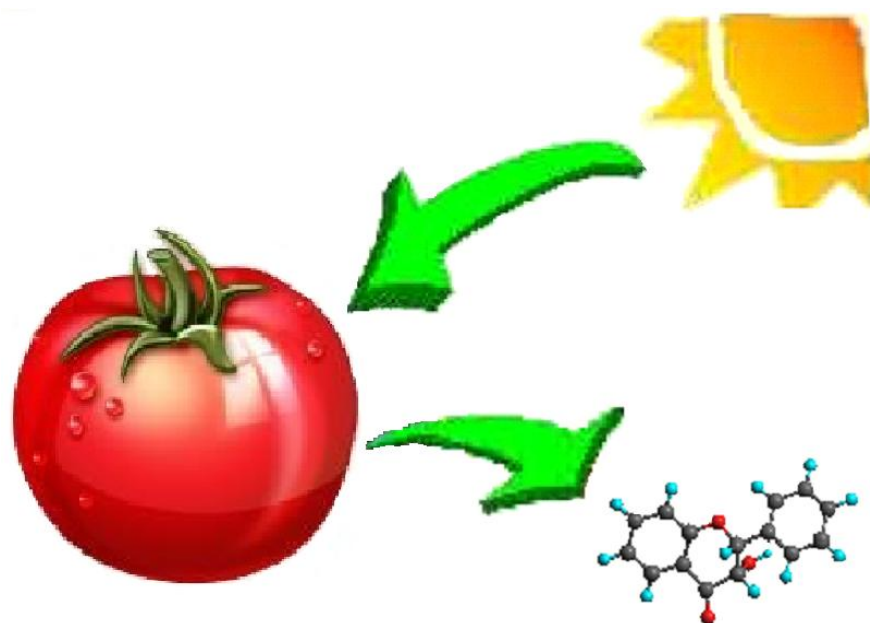
and it has been used to confirm the identification of some antioxidant compounds.

The authors gratefully acknowledge Contracts C019 and 2085 of the Consejería de Agricultura y Pesca of the Junta de Andalucía. They also gratefully acknowledge the financial support of Project CTQ2005-01914/BQU and Grant AP-2005-2985 from Ministerio de Educación y Ciencia.

5 References

- [1] Marcucci, M. C., *Apidologie* 1995, 26, 83–99.
- [2] Bankova, V., *eCAM* 2005, 2, 29–32.
- [3] Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Kalpana, S. A., *J. Ethnopharmacol.* 1991, 35, 77–82.
- [4] Ghisalberti, E., *Bee World* 1979, 60, 59–84.
- [5] Burdock, A., *Food Chem. Toxicol.* 1998, 36, 347–363.
- [6] Matsuda, S., *J. Jap.* 1994, 160, 64–73.
- [7] Pietta, P. G., Gordana, C., Pietta, A. M., *Fitoterapia* 2002, 73, S7–S20.

- [8] Pereira, A. D., Norsell, M., Cardoso, J. N., Neto, F. R. D., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5226–5230.
- [9] Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S., Sabatini, A. G., *Z. Naturforsch.* 2002, 57c, 530–533.
- [10] Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V., *Phytomedicine* 2005, 112, 221–228.
- [11] Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., *et al.*, *Phytochem. Anal.* 2004, 15, 235–240.
- [12] Park, Y. K., Koo, M. H., Abreu, J. A. S., Ikegaki, M., *et al.*, *Current Microbiol.* 1998, 36, 24–28.
- [13] Park, Y. K., Alencar, S. M., Aguiar, C. L., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2502–2506.
- [14] Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., *et al.*, *J. Ethnopharmacol.* 2002, 80, 1–7.
- [15] Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., Nakayama, T., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7286–7292.
- [16] Park, Y. K., Ikegaki, M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62, 2230–2232.
- [17] Fu, S. H., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C., *J. Food Drug Anal.* 2005, 13, 43–50.
- [18] Lu, Y., Wu, C., Yuan, Z., *Fitoterapia* 2004, 75, 267–276.
- [19] Volpi, N., *Electrophoresis* 2004, 25, 1872–1878.
- [20] Cao, Y. H., Wang, Y., Yuan, Q., *Chromatographia* 2004, 59, 135–140.
- [21] Hilhorst, M. J., Soasen, G. W., de Jong, G. J., *J. High Res. Chromatogr.* 1998, 21, 608–612.
- [22] Chi, H., Hsieh, A. K., Ng, C. L., Lee, H. K., Li, S. F. Y., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 593–597.
- [23] Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1084, 54–62.
- [24] Arráez-Román, D., Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Martín-Lagos-Contreras, J. A., Fernández-Gutiérrez, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 2197–2207.
- [25] Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1648–1656.
- [26] Huck, C. W., Stecher, G., Ahrer, W., Stöggel, W. M., *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 904–908.
- [27] Lafont, F., Aramendia, M. A., García, I., Borau, V., *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrometry* 1999, 13, 562–567.
- [28] Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 283–303.
- [29] Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1220–1234.
- [30] Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V., *Phytomedicine* 2005, 12, 221–228.
- [31] Bruker Daltonics Technical Note #008, Molecular formula determination under automation.
- [32] Tanaka, Y., Kishimoto, Y., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1998, 817, 49–57.
- [33] Klampfl, C. W., Ahrer, W., *Electrophoresis* 2001, 22, 1579–1584.
- [34] Vuorensola, K., Kokkonen, J., Sirén, H., Ketola, R. A., *Electrophoresis* 2001, 22, 4347–4354.
- [35] Sheppard, R., Tong, X., Cai, J., Henion, J. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2054–2058.
- [36] Voyksner, R. D., in: Cole, R. B. (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Wiley, New York, 1997, p. 323.
- [37] Macià, A., Borrull, F., Callul, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 2004, 25, 3441–3449.
- [38] Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1562–1568.
- [39] Fu, S., Yang, M., Wen, H., Chern, J., *J. Food Drug Anal.* 2005, 13, 43–50.
- [40] Volpi, N., *Electrophoresis* 2004, 25, 1872–1878.
- [41] Markham, K. R., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., Lu, Y., *Phytochemistry* 1996, 42, 205–211.
- [42] Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S., Nakayama, T., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7286–7292.
- [43] Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B. S., Anklam, E., *J. Sci. Food Agric.* 2001, 81, 485–496.



BLOQUE TEMÁTICO III
DETERMINACIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS Y
OTROS METABOLITOS EN TOMATE

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE ANTIOXIDANTES EN TOMATE: COMPONENTES TÍPICOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

Los antioxidantes juegan un papel muy importante en la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, por su empleo como aditivos para ayudar a preservar los alimentos¹⁵³. Además, en los últimos años el interés en estos compuestos se ha incrementado debido a sus efectos sobre la salud¹⁵⁴.

Para proteger a las células, el organismo ha desarrollado un sistema antioxidante complejo (sistemas de extinción) que comprende numerosos compuestos endógenos capaces de neutralizar los radicales libres. Sin embargo, determinadas situaciones cotidianas aumentan su producción, haciendo insuficiente las defensas endógenas y provocando que la protección del organismo dependa de la ingesta de los antioxidantes derivados de la dieta (*figura 4.1*).

Uno de los argumentos empleados para explicar el efecto beneficioso sobre la salud de la dieta mediterránea es el elevado consumo de compuestos antioxidantes. La dieta tradicional mediterránea es una dieta sana y saludable, que incluye una gran proporción de alimentos de origen vegetal (cereales, frutas, hortalizas y vegetales de todo tipo, frutos secos, vino y aceite de oliva). En estos alimentos la existencia de compuestos antioxidantes obedece, primordialmente, a la necesidad de auto-protegerse de la oxidación, favorecida

¹⁵³ Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., *Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods*, J. Sep.Sci. 2005, 28, 883-897.

¹⁵⁴ Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe D.K., *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York, 1996.

por las elevadas radiaciones solares y las cálidas temperaturas que gozan los países de la cuenca mediterránea^{155,156}.

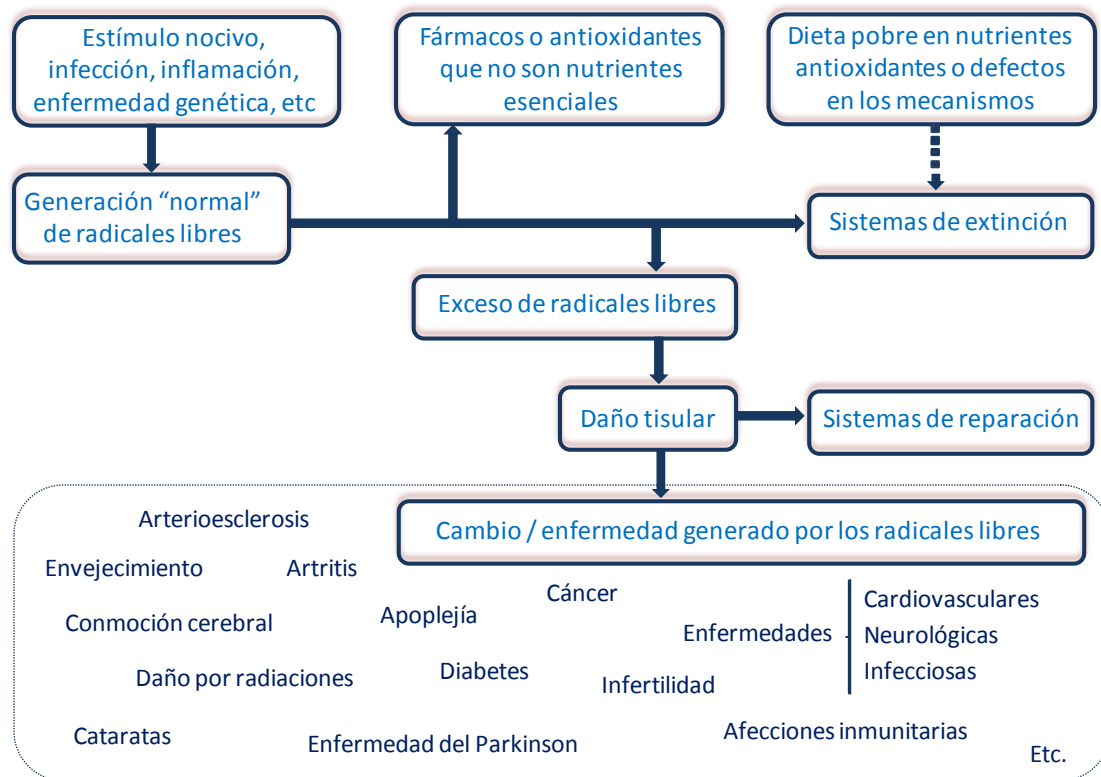


Figura 4.1. "Teoría oxidante de la enfermedad" y los factores que pueden favorecer o desfavorecer las lesiones por radicales libres^{157,158}

Aunque originario de América, el tomate es hoy día uno de los principales alimentos presentes en la dieta mediterránea. Su consumo, ya sea fresco o procesado (zumos, sopa, salsa, ketchup), es mucho más elevado que el de cualquier otra fruta o verdura, debido en parte a sus precios accesibles y a su disponibilidad durante todo el año. Los beneficios sobre la salud que ejerce el consumo de tomate y de sus productos han sido tradicionalmente atribuidos a la presencia de compuestos con capacidad antioxidante: carotenos, vitaminas y, sobre todo, a los compuestos fenólicos.

En este capítulo del tercer bloque temático se recoge una revisión bibliográfica de los trabajos publicados entre 2000 y 2007 relativos a las técnicas analíticas empleadas en la determinación de compuestos antioxidantes presentes en tomate. Se describen, por tanto,

¹⁵⁵ Ghiselli, A., D'Amicis, A., Giacosa, A., *The antioxidant potential of the Mediterranean diet*, Eur. J. Cancer Prev. 1997, 6, S15-S19.

¹⁵⁶ Tur, J.A., *Los antioxidantes en la dieta mediterránea*, Rev. Esp. Nutr. Comunitaria 2004, 10, 198-207.

¹⁵⁷ Webb, G.P., *Complementos nutricionales y alimentos funcionales*, Acibria, Zaragoza, 2007.

¹⁵⁸ Kaliora, A.C., Dedoussis, G.V.Z., Schmidt, H., *Dietary antioxidants in preventing atherogenesis*, Atherosclerosis 2006, 187, 1-17.

las diferentes metodologías analíticas puestas a punto para el análisis de dichos compuestos de forma global (métodos espectrofotométricos) o para su identificación individual (métodos cromatográficos y electroforéticos acoplados a distintos métodos de detección). La elección de la técnica analítica va a depender del objetivo del análisis y, por tanto, de los compuestos que van a ser determinados. HPLC ha sido la técnica de elección en el análisis de antioxidantes en tomate.

Este trabajo se ha publicado en la revista *Journal of Separation Science* bajo el título ***“Analytical determination of antioxidants in tomato: typical components of the Mediterranean diet”***.

María Gómez-Romero
David Arráez-Román
Antonio Segura-Carretero
Alberto Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical
Chemistry, Faculty of Sciences,
University of Granada, Granada,
Spain

Review

Analytical determination of antioxidants in tomato: Typical components of the Mediterranean diet

Diets in the countries of the Mediterranean basin are characterised by abundant plant foods (fruits, vegetables, breads, nuts, seeds, wine, and olive oil) and include fish and low-fat dairy products. Among the vegetables, tomatoes are a main component of the traditional Mediterranean diet, which has been associated with health protection and longevity. Eating tomatoes has been associated with reduced risks of some types of cancer and other diseases. These beneficial properties appear to be related to the antioxidant content of the fruit, particularly carotenoids (lycopene and β -carotene), ascorbic acid, and phenols, which may play a role in inhibiting reactions mediated by reactive oxygen species. Due to the importance of antioxidant compounds in tomatoes and tomato products, we present here an overview of current analytical methods (from 2000 until the present date) for determining the different antioxidants. The analytical procedures used to determine individual compounds involve extraction from the sample, analytical separation, and quantification. The choice of analytical method depends on the particular focus of the analysis and the kind of product analysed. High-performance liquid chromatography is the technique of choice for the analysis of tomato antioxidants.

Keywords: Analysis / Antioxidants / Mediterranean diet / Tomato

Received: October 2, 2006; revised: November 22, 2006; accepted: December 21, 2006

DOI 10.1002/jssc.200600400

1 Introduction

1.1 What is the Mediterranean diet?

Although different countries in the Mediterranean area have their own diets, these are all considered as variants of the so-called Mediterranean diet. Indeed the dietary patterns prevailing in the Mediterranean area have many common characteristics, above all the fact that olive oil occupies a central position in all of them. Olive oil is important not only because of its various beneficial properties, but also because it allows the consumption of

large quantities of vegetables as salads and equally large quantities of legumes as cooked foods [1].

In general, the Mediterranean diet is characterised by: (i) High consumption of olive oil (emphasis on consuming monounsaturated fat). (ii) High consumption of fruits, vegetables, breads, cereals (such as pasta, beans, nuts, and seeds). (iii) Moderate consumption of fish and poultry. (iv) Moderate consumption of wine. (v) Low consumption of eggs and red meat.

The high content in the diet of vegetables, fresh fruits, and cereals, and the liberal use of olive oil guarantee an adequate intake of antioxidant compounds [2]. The high consumption of antioxidant compounds is one of the arguments used to explain the beneficial effect of the Mediterranean diet in the prevention of cardiovascular and coronary heart disease, and possibly several forms of cancer and other diseases [3–5].

Correspondence: Dr. Antonio Segura-Carretero/Dr. Alberto Fernández-Gutiérrez, Research group FQM-297, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: ansegura@ugr.es (Dr. Antonio Segura-Carretero); albertof@ugr.es (Dr. Alberto Fernández-Gutiérrez)
Fax: +349 58249510

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate); DMPD, *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine; DPIP, 2,6-dichlorophenolindophenol; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP, ferric reducing ability of plasma; HSCCC, high-speed counter-current chromatography; PCL, photochemiluminescence assay; TAA, total antioxidant activity; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity

1.2 The role of antioxidants

The high level of solar radiation and the high temperature prevailing in the regions of the Mediterranean basin forces plants to develop defence mechanisms against ultraviolet radiation and excessive production of free radicals through the accumulation of antioxidant sub-

stances [6]. These are both natural and synthetic compounds possessing the ability to reduce the rate of oxidation reactions [7].

Antioxidants can be classified by their mechanism of action as follows [8]: (i) Primary antioxidants, which are capable of stabilising or deactivating free radicals by donating hydrogen or electrons to them before they attack cells [9]. (ii) Synergistic antioxidants, which are classified as oxygen scavengers and chelators (redox activity). (iii) Secondary antioxidants, which prevent oxidation by decomposing lipid peroxides into stable end products.

To protect the cells and organ systems of the body against reactive oxygen species, humans have evolved a highly complex antioxidant protection system. It actually involves a variety of endogenous and exogenous components acting interactively and synergistically to neutralise free radicals. Endogenous antioxidants are absolutely critical for maintaining optimal cellular and systemic health and well-being. However, in case of exposure to alcohol, medications, trauma, cold, infections, poor diet, toxins, radiation, or strenuous physical activity, endogenous antioxidant defence is not sufficient to counteract oxidative stress; protection depends upon the supply of antioxidants derived from the diet such as vitamins C and E, carotenoids, polyphenols and other low molecular weight compounds [9].

Nowadays, interest in antioxidant compounds has increased in the light of recent evidence regarding the important role of antioxidants in human health as preventive and therapeutic agents [10]. Epidemiological evidence shows that increased levels of fruit and vegetables in the diet reduce the risk of cancer and heart disease [11, 12].

Free radicals have been claimed to play a role in more than 100 diseases, including cancer, stroke, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, neurological degeneration, and cataracts, though there is currently proof that free radicals are involved in the pathogenesis of only a few diseases [13–15]. These include two of the major causes of death in Western society, coronary heart diseases and cancer, and also a major factor which influences the quality of life, cataracts. Antioxidants are thought to decrease the risk of these diseases by lowering the concentration of free radicals and so reducing the likelihood that one of these radicals will cause an initiation event [16]. At first much attention was paid to the properties of vitamins C and E and carotenoids. In recent years the powerful antioxidant capacity of the polyphenols has been attracting much attention.

1.3 Antioxidants in tomato

Although not indigenous to the Mediterranean area but introduced from South America at the beginning of the

eighteenth century, the tomato and its products are now important components of the Mediterranean diet [17]. Their average daily consumption is higher than that of all other fruits and vegetables because of their year-round availability and accessible prices. In botany, tomato is a fruit (true fruits are developed from the ovary at the base of the flower, and contain the seeds of the plant, although some cultivars may be seedless). However, from a culinary perspective, the tomato is not as sweet as those foodstuffs usually called fruits and it is typically served as part of a main course of a meal, as are other vegetables, rather than as dessert.

The consumption of tomatoes (*Solanum lycopersicum*, formerly *Lycopersicon lycopersicum*) and tomato products has been associated with a lower risk of developing digestive tract and prostate cancer [18, 19]. They are rich in antioxidant micronutrients and constitute almost the sole available source of lycopene. Other carotenes (such as β -carotene and lutein), vitamin C, and various phenolic compounds are also thought to be health-promoting factors with antioxidant properties [20]. Tomato antioxidant content depends on the cultivar (genetic factors), maturity, and both agronomic and environmental conditions during cultivation [21–23].

Lycopene is one of the main antioxidants to be found in fresh tomatoes and processed tomato products. Because of the presence of long-chain conjugated double bonds, lycopene has been reported to possess higher antioxidative activity than luteolin or β -carotene. Lycopene content also accounts for the redness of the fruit [9], which is one of the main qualities industry and consumers now look at. Colour also serves as a measure of total quality for tomato and tomato products.

Lycopene in fresh tomato fruits occurs essentially in the all-*trans* configuration. It needs to be protected from excessive heat and extreme pH conditions, exposure to light, oxygen, and lipid-degrading enzymes in order to prevent its oxidation and isomerisation, which are the main causes of tomato lycopene degradation during processing [24]. Thermal processing generally causes some loss of lycopene in tomato-based foods. The *cis*-isomers increase with temperature and processing time. In general, dehydrated and powdered tomatoes have poor lycopene stability unless carefully processed and promptly placed in a hermetically sealed and inert atmosphere for storage. Frozen foods and heat-sterilised foods exhibit excellent lycopene stability throughout their normal temperature storage shelf life [24].

One of the most interesting aspects of the potential link between carotenoid consumption and chemoprevention is that lycopene shows a greater bioavailability from processed tomato products (e.g. paste, puree, sauce) than from the raw vegetable [25] and that addition of olive oil further promotes absorption [26, 27]. The traditional Mediterranean habit of consuming processed,

cooked tomato products (*e.g.* over pasta or pizza) might thus add value to the health-promoting properties of tomato. β -Carotene (vitamin A precursor) is a very well known and much studied carotenoid. It is a lipid-soluble vitamin, which is carried with vitamin E in the fatty core of lipid particles. It is found mainly in high concentrations in carrots and in dark green leafy vegetables.

Vitamin C, including both ascorbic and dehydroascorbic acid, is important in the protection of the tomato itself against autoxidative damage that might increase with ripening due to enhanced respiration [28]. Besides its antioxidant effect, ascorbic acid is indispensable for life because of its vitamin action in which it plays many physiological roles. It can be synthesised by plants and by the vast majority of mammals, but not by humans [29]. The principal sources of vitamin C are citrus fruits, tomatoes, and potatoes.

Ascorbic acid is relatively stable in tomatoes because of the acidic conditions found in the tissue [30]. However, it is easily destroyed by oxidation, exposure to light, or high temperatures. Significant losses of ascorbic acid can occur during the post-harvest storage period. Reducing the temperature from room temperature (20°C) to chill (4°C) or further reduction to freezer temperatures (-18°C) decreases the rate of loss [31]. The enzyme-catalysed oxidation reactions responsible for this spoilage can be eliminated by thermal treatment. Losses are inevitable with processing or cooking involving heat and water since ascorbic acid is heat sensitive and water soluble. Tomato should rapidly attain the processing temperature, in the minimum of water, and be held at this temperature for the minimum time possible [31].

Natural vitamin E is a mixture of tocopherols and tocotrienols which differ in the number and position of the methyl groups on the chroman ring (α -, β -, γ -, and δ -tocopherol, and α -, β -, γ - and δ -tocotrienol) synthesised only by plants. Of all the isomers and analogues, RRR- α -tocopherol has the highest biological activity and also is by far the most abundant component in plasma and tissues [32]. The natural sources are nuts, green leafy vegetables, and vegetable oils.

Phenolic compounds or polyphenols are major components of the Mediterranean diet. These compounds are secondary metabolites synthesised by plants, both during normal development and in response to stress conditions [33]. In plants, phenolics may act as phytoalexins, antifeedants, attractants for pollinators, contributors to plant pigmentation, antioxidants, and protective agents against UV light, among others. In food, phenolics may contribute to the bitterness, astringency, colour, flavour, odour, and oxidative stability of food [33]. Polyphenols are normally found in conjugated forms, mainly with a sugar molecule, and associated with most plant cell walls. The interest in polyphenols as antioxidants is centred on flavonoids.

Due to the importance of antioxidant compounds in tomatoes and tomato products, we present here an overview of current analytical methods (from 2000 until the present date) for determining the different antioxidant compounds contained in these products. Since high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV/vis detection is the technique of choice for the analysis of tomato antioxidants, mainly this method will be reported and discussed. This overview is the third in a series about antioxidant compounds in food products [34, 35].

2 Analysis of the different types of antioxidants in tomato and tomato products

In general, the analytical procedure for the determination of individual compounds involves three basic steps: extraction from the sample, analytical separation, and quantification. Several methods have been developed for the different types of antioxidant compounds; however, HPLC–UV is the most widely employed approach.

2.1 Carotenoids

Around 500 carotenoids have been identified in dietary vegetables and fruit. Amongst them, lycopene activity has recently attracted substantial interest. Its determination can be carried out by physical and chemical methods.

Physical methods are based on the relation of colour parameters to lycopene concentration in the samples. These methods are rapid, inexpensive, and require no hazardous chemicals. Arias *et al.* [36] measured the lycopene content by HPLC and tomato skin colour at different ripening stages with a Minolta Chromameter. The L^* , a^* , b^* , hue, chroma and lycopene content values were correlated with the maturity stage of the tomatoes.

In chemical analysis, lycopene is extracted from tomato tissues and quantified. The preparation of samples for analytical study depends upon both the nature of the matrix (*e.g.* juice, pulp, outside layers, fresh, processed, *etc.*) and the analytes. Because lycopene is liposoluble, it is usually extracted with organic solvents such as ethanol, acetone, petroleum ether, hexane, benzene, chloroform, heptane, *etc.* [24] and mixtures of them. A mixture of hexane with acetone and ethanol or methanol is often used [22–36, 37–40] because (i) carotenoids react with peroxides that may be contained in other solvents such as diethyl ether and tetrahydrofuran [41], (ii) recovery rates with mixtures including ethyl acetate are very low [42], and (iii) the stability of lycopene extracts and the extraction efficiency obtained with hexane is higher than that of extracts obtained with other organic solvents such as chloroform, methanol, or dichloromethane [38, 43].

Before and after extraction, tomato samples should be stored in the dark in the freezer (around -20°C). Mechanical grinding of the tomato material can be used to facilitate complete extraction. Dehydrated material may be extracted with water-immiscible solvents. To attain complete extraction, moistening of dehydrated material prior to solvent extraction is often necessary. However, extraction processing is more commonly carried out with hydrated samples or fresh material. Generally, current methods used to extract lycopene tend to be time-consuming procedures and prone to errors due to oxidation or other losses during the extraction. Because of the conjugated double bonds, lycopene is unstable and very sensitive to light, heat, oxygen, and acids. Extractions should be performed under mild light, in an inert atmosphere, and with minimum heating [24]. To avoid oxidation and isomerisation of lycopene during the extraction process, antioxidants [44] and neutralising agents such as magnesium carbonate [42, 45, 46] or sodium carbonate [47] may be added.

At present, a large quantity of skin and outer pericarp tissue are normally discarded as tomato processing waste in the peeling procedure of tomato processing. Recent studies have described a lycopene supercritical fluid extraction with carbon dioxide as extraction medium. It offers advantages associated with the high diffusivity and low viscosity of supercritical media. It is also easy to connect on-line with chromatographic techniques because CO_2 is gaseous under ambient conditions [48]. This procedure enables the extraction of over 60% of lycopene from tomato waste products [49, 50].

Lycopene can be subsequently quantified spectrophotometrically [30, 37, 40, 51, 52] or by chromatographic separations. Amongst the chromatographic methods, HPLC is the most widely used. Both normal phase and reversed phase HPLC methods, operating with isocratic or gradient elution with a wide variety of mixtures of different organic solvents as mobile phases, have been used to separate and quantify carotenoids in fruits and vegetables [38]. Total lycopene content has been analysed by reverse-phase HPLC systems using C_{18} as stationary phase [38, 45, 46, 53, 54]. However, a more effective separation has been achieved by using a C_{30} stationary phase [37, 39, 42, 44, 55–58]. Other stationary phases have also been employed [28, 59, 60]. The UV-vis detector is the one most commonly used. Mass spectrometry has been utilised as well [46]. HPLC conditions for determination of lycopene in tomato and tomato products are listed in Table 1.

Capillary electrochromatography (CEC) [47], high-speed counter-current chromatography (HSCCC) [61], one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy [62], and an optothermistor [63] have also been employed.

Purification of lycopene by HSCCC [61] has three advantages compared to column chromatography:

(i) Being a support-free liquid-liquid partition chromatographic technique, it eliminates irreversible adsorption of the sample on the solid support; (ii) the maximum capacity in HSCCC is much larger than that in HPLC with an excellent recovery, and, finally, (iii) HSCCC permits introduction of a crude sample directly into the column.

Bicanic *et al.* [63] have reported the first use of an optothermistor as a detector for lycopene in a wide range of thermally processed tomato-based foods. The optothermistor is a device consisting of a thin disk of sapphire (optically transparent and of high thermal conductivity) and a ring-shaped thermistor. Despite their optical opacity, all samples could be studied as preparatory steps are avoided. Sample placed on top of the sapphire disk selectively absorb the periodically modulated laser radiation, thereby generating heat and hence also thermal waves. Such a periodic temperature rise/drop in the sample is sensed by the optothermistor and ultimately converted into a voltage at the given modulation frequency. The performance of the new device was evaluated by comparing obtained data to those acquired by conventional methods (absorption spectrophotometry and HPLC).

Compared to lycopene, the β -carotene content in tomato is negligible. Usually determinations of both carotenoid contents are simultaneously carried out following the same procedure [38, 42, 45–47, 57].

2.2 Vitamins

Levels of ascorbic acid have been measured by two different methods, titration with 2,6-dichlorophenolindophenol (DPIP) [22, 40, 51, 52, 64] and HPLC [46, 57, 59, 60, 65]. HPLC conditions for determination of ascorbic acid in tomato and tomato products are listed in Table 2.

Titration can be carried out in different ways. For example, dried tomato powder was mixed with buffer solution made up of oxalic acid and sodium acetate anhydrous [51, 52]. This was titrated against solution containing DPIP and sodium bicarbonate using an autotitrator calibrated using standard ascorbic acid. Other authors [40] extracted tomato samples with metaphosphoric acid. The extract was centrifuged, DPIP was added to the supernatant, and then measured at 515 nm *versus* the blank by an UV/vis spectrophotometer.

Galiana-Balaguer *et al.* [64] developed a method for the determination of L-ascorbic acid in different species of the *Lycopersicon* genus by capillary zone electrophoresis. This new method was compared with two routine methods, enzymatic assay and potentiometric titration with DPIP. The CZE method gave lower detection limits. It was quicker, cheaper, and highly reproducible, used minimum sample volume, and could be applied to the analysis of large series of samples.

Tomato is not a rich source of vitamin E and the number of studies on its content in tomato and tomato-based

Table 1. HPLC conditions for determination of lycopene in tomato and tomato products.

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction solvent	Observations	Ref.
YMC C ₃₀ column (5 µm particle size; 250 × 4 mm id)	Methyl alcohol/MTBE (3:7)	Isocratic	UV (471 nm)	Hexane/acetone/EtOH (50:25:25)	HPLC and L*, a*, b* colour readings of hydroponic tomato	[36]
Suplex C ₃₀ column (5 µm particle size)	A: MeOH; B: MTBE Flow rate 1 mL/min	Gradient	UV (190–600 nm)	Hexane/acetone/EtOH (50:25:25)	Effects of genotype and cultivation environment in red-ripe tomatoes.	[37]
µBondapak C ₁₈ (10 µm particle size; 300 × 2 mm id) with µBondapak C ₁₈ precolumn (10 µm particle size; 20 × 3.9 mm)	THF/ACN/MeOH (15:30:55, v/v/v) Flow rate 0.9 mL/min	Isocratic	UV (475 nm)	Hexane/acetone/EtOH (50:25:25, v/v/v)	Lycopene and β-carotene in Spanish commercial tomato and vegetables. Several solvents and mobile phases were assayed, here is the most efficient.	[38]
YMC C ₃₀ column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id) with C ₃₀ cartridge precolumn (10 × 4 mm)	A: MeOH; B: MTBE Flow rate 1 mL/min	Gradient	UV (478 nm)	Hexane/acetone/EtOH (2:1:1)	Carotenoid content in various tomato species and other vegetables.	[39]
YMC C ₃₀ column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	A: 1-butanol/ACN (30:70, v/v); B: methylene chloride Flow rate 2 mL/min	Gradient	UV (476 nm)	EtOH/ hexane (4:3, v/v)	Carotenoids in tomato juice. Several solvents and mobile phases were assayed, here is the most efficient.	[42]
YMC RP C ₃₀ column (3 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	MTBE/MeOH/ethyl acetate (40:50:10, v/v/v) Flow rate 1 mL/min	Isocratic	UV	MeOH + 0.01% ethylenediamine tetraacetic acid and t-butyl-4-methoxyphenol	Pericarp tissue. <i>Cis</i> - and <i>trans</i> -lycopene isomers.	[44]
Intersil ODS2 RP C ₁₈ column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	ACN/MeOH/ dichloromethane/hexane (50:40:5:5, v/v/v/v) Flow rate 1 mL/min	Isocratic	UV (453 nm)	Acetone + BHT, MgCO ₃ and crystal sand.	Subsequent saponification. Pericarp sections during growth and maturation. Lycopene and β-carotene.	[45]
Symmetry C ₁₈ column (3.5 µm particle size; 75 × 4 mm id) coupled to Atlantis dC ₁₈ column (5 µm particle size; 150 × 2 mm id)	MeOH/THF/ACN (60:30:10, v/v/v)	Isocratic	MS	THF/MeOH (1:1, v/v) + MgCO ₃	Lycopene and β-carotene fresh and dried tomato and tomato in tin enriched.	[46]
Supelcosil C ₁₈ column (250 × 4.6 mm id)	A: ACN; B: MeOH/ hexane/ dichloromethane (1:1:1, v/v/v/v) Flow rate 0.8 mL/min	Gradient	DAD	THF + BHT and resuspended in CHCl ₃	Carotenoid content in elongated, salad, cluster and cherry tomatoes.	[53]
Supelcosil C ₁₈ column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	A: ACN; B: MeOH/ hexane/ methylene (1:1:1, v/v/v/v) Flow rate 1 mL/min	Gradient	UV (471 nm for lycopene and 465 nm for β-carotene)	Tetrahydrofuran + 0.01% BHT	Lycopene and β-carotene in tomato products. Comparison with photothermal method.	[54]
YNC C ₃₀ column (250 × 4.6 mm id) coupled to a C ₃₀ guard (20 × 4.6 mm)	A: MeOH/H ₂ O (80:20, v/v) + 0.2% (w/v) ammonium acetate; B: MTBE Flow rate 1 mL/min	Gradient	UV (470 nm)	DCM/water (1:1, v/v)	Mediterranean tomato variety.	[55]
YMC RP C ₃₀ column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id) coupled to a C ₃₀ guard column (20 × 4.6 mm)	A: MeOH; B: 20% aq. MeOH + 0.2% ammonium acetate; C: MTBE Flow rate 1 mL/min	Gradient	UV (200–600 nm)	In MeOH + tris-HCl (50 mM, pH 7.5 + 1 mM NaCl) for 10 min, then in chloroform	Carotenoids in commonly consumed fruits and vegetables.	[56]
Supelcosil C ₁₈ column (250 × 4.6 mm id)	A: ACN; B: MeOH/ hexane/ dichloromethane (1:1:1, v/v/v/v) Flow rate 0.8 mL/min	Gradient	DAD	THF + BHT and resuspended in CHCl ₃	Cherry tomatoes harvested in different ripening stages.	[57]

Table 1. Continued ...

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction solvent	Observations	Ref.
YMC C ₃₀ column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	A: MeOH; B: MTBE Flow rate 1.3 mL/min	Gradient	UV (450 nm)	MeOH/THF (1:1, v/v) + 0.1% BHT	Carotenoids during tomato processing.	[58]
Eclipse XDB-C ₈ column (5 µm particle size; 150 × 4.6 mm id)	ACN/MeOH (70:30, v/v) Flow rate 0.6 mL/min	Isocratic	UV (450 nm)	Ethyl acetate	Effects of seasonal variations or postharvest ripening in cherry tomatoes. Lycopene and β-carotene.	[28, 59]
RP-Ultrasphere column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	ACN/MeOH/H ₂ O/ethyl acetate (43.7:6:0.3:50)	Isocratic	UV (450 nm)	Ethyl acetate	Antioxidant properties during on-vine ripening of tomatoes and correlations with lycopene and β-carotene content.	[60]
Supercosil ODS column (250 × 4.6 mm id)	ACN/MeOH/ chloroform (47:47:6, v/v/v) Flow rate 1 mL/min	Isocratic	UV (472 and 254 nm)	Chloroform/MeOH (2:1)	Crude extract of tomato paste, lycopene standard and fractions from HSCCC analysed by HPLC.	[61]
3 mm polymeric C ₃₀ column (250 × 4.6 mm id) with a YMC C ₃₀ guard column	A: MeOH; B: MTBE Flow rate 1 mL/min	Gradient	UV (200–800 nm)	MeOH + CaCO ₃ and Celite. Subsequent extraction with acetone/hexane (1:1)	NMR analysis and HPLC separation. Carotenoids in tomato juice.	[62]
Supelcosil C ₁₈ (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	A: ACN; B: MeOH/hexane/ methylene chloride (1:1:1) Flow rate 0.8 mL/min	Gradient	UV	THF + 0.01% BHT	Optothermistor for the quantification of lycopene in processed-tomato products. Verification versus spectrophotometry and HPLC.	[63]

Table 2. HPLC conditions for determination of ascorbic acid in tomato and tomato products.

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction solvent	Observations	Ref.
Symmetry C ₁₈ column (3.5 µm particle size; 75 × 4 mm id) coupled to Atlantis dC ₁₈ column (5 µm particle size; 150 × 2 mm id)	MeOH (0.005% acetic acid)/acetic acid 0.05% (70:30)	Isocratic	MS	MeOH + meta-phosphoric acid + acetic acid	Analysis of four varieties of tomato, tomato-based products, mango and kiwi.	[46]
Capcell Pak NH ₂ (250 × 4.6 mm)	ACN/H ₂ O/H ₃ PO ₄ (80:20:0.75, v/v/v) + monobasic potassium phosphate Flow rate 1 mL/min	Isocratic	Coulometric electrode array detector (ESA)	Not indicated	Nutritional value of cherry tomatoes at different ripening stages.	[57]
NH ₂ -Kromasil 100 column (5 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	5 mM KH ₂ PO ₄ /ACN (80:20) Flow rate 1 mL/min	Isocratic	UV (260 nm)	Sodium phosphate	Effects of seasonal variations and postharvest ripening in cherry tomatoes.	[28, 59]
NH ₂ -Kromasil 100 column (10 µm particle size; 250 × 4.6 mm id)	5 mM KH ₂ PO ₄ /ACN (60:40) Flow rate 1 mL/min	Isocratic	UV (250 nm)	Sodium phosphate	Changes in antioxidant activity during on-vine ripening of tomatoes.	[60]
Eurosphere 100 column (5 µm particle size; 250 × 4 mm id)	H ₂ O (pH 2.2) Flow rate 1 mL/min	Isocratic	UV (245 nm)	Meta-phosphoric acid	Alterations of vitamin C in processed tomatoes.	[65]

ACN = acetonitrile; MeOH = methanol.

products from 2000 until the present is very small. Moreover, since vitamin E is present in large amounts in tomato seeds [20] and they are not easily digested by humans, the beneficial effect of vitamin E of fresh tomato is questionable. However, the references found are presented here.

Vitamin E is not water soluble and it has been extracted with different organic solvents: hexane [58] and mixtures of methyl *tert*-butyl ether/petroleum ether [66] and hexane/ethyl acetate [67]. Vitamin E has been measured using HPLC–UV [57, 67] and HPLC with fluorescence detection [58]. Chun *et al.* [67] found higher vita-

Table 3. HPLC conditions for determination of phenolic compounds in tomato and tomato products.

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction solvent	Phenolics detected	Observations	Ref.
C ₁₈ Luna column (100 × 4.6 mm id)	A: 0.05% TFA (pH 2); B: MeOH	Gradient	UV (365 nm, 280 nm)	MeOH/H ₂ O 60% + 20 mM sodium diethylthiocarbamate (antioxidant) + 1.2 M HCl (acid hydrolysis)	Flavonoids: quercetin, kaempferol, naringenin. Hydroxycinnamic acids: chlorogenic, caffeic, <i>p</i> -coumaric and ferulic acids (without hydrolysis).	Analysis of various commercial tomato varieties.	[23]
C ₁₈ Nova-Pak column (250 × 4.6 mm id)	A: MeOH/H ₂ O/5 M HCl (80:20:0.1, v/v); B: ACN Flow rate 0.6 mL/min	Gradient	UV (320 nm)	MeOH/H ₂ O 50%	Chlorogenic acid, caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid, rutin, naringenin.	Effects of food processing on flavonoids.	[55]
Supelcosil LC-18 column (250 × 4.6 mm id) with a Perisorb Supelguard LC-18	ACN/H ₂ O pH 2.5 (adjusted with trifluoroacetic acid) Flow rate 1 mL/min	Gradient	Coulometric electrode array detector (ESA)	MeOH/H ₂ O 50% + 1.2 M HCl (acid hydrolysis)	Chlorogenic acid, caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, rutin, quercetin, naringenin.	Nutritional value of cherry tomatoes at different ripening stages.	[57]
Eclipse XDB-C ₈ column (5 μm particle size; 150 × 4.6 mm id)	A: 0.05% TFA in H ₂ O; B: 0.05% TFA in ACN Flow rate 0.8 mL/min	Gradient	UV (280 nm, 320 nm; 370 nm)	Acidic MeOH (0.05% TFA, v/v)	Naringenin, chalconaringenin, rutin, chlorogenic acid.	Effects of seasonal variations and postharvest ripening in cherry tomatoes.	[28, 59]
Genesis C ₁₈ cartridge column (4 μm particle size; 150 × 3 mm id) fitted with a Genesis C ₁₈ guard column	ACN/H ₂ O pH 2.5 (adjusted with trifluoroacetic acid) Flow rate 0.5 mL/min	Gradient	UV (365 nm)	MeOH/H ₂ O 50% + 20 mM sodium diethylthiocarbamate (antioxidant) + 1.2 M HCl (acid hydrolysis)	Quercetin, kaempferol and conjugates.	Flavonols in tomato and tomato-based products.	[68]
X-Terra C ₁₈ (5 μm particle size; 150 × 2.1 mm id)	A: 0.1% acetic acid; B: ACN Flow rate 0.4 mL/min	Gradient	DAD (320 and 350 nm)	Acetone/H ₂ O (4:1, v/v)	Chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, rutin, naringenin, naringenin chalcone, rutin pentoside, chlorogenic acid derivative.	Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars.	[69]
C ₁₈ Nova-Pak column (5 μm particle size; 250 × 4.6 mm id)	A: MeOH/H ₂ O/HCl (20:80:0.1, v/v); B: ACN/ MeOH (1:1) Flow rate 0.6 mL/min	Gradient	DAD (320 nm)	MeOH/H ₂ O (2:1) (posterior β-glucosidase treatment, enzymatic hydrolysis)	Chlorogenic acid, rutin, quercetin, kaempferol-3- <i>o</i> -rutinoside, chalconaringenin, naringenin. New compounds after β-glucosidase treatment: caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid	Antioxidant capacity and flavonoids content of various tomato varieties.	[70]
Nova-Pak C ₁₈ column (4 μm particle size; 150 × 3.9 mm) with a Perisorb RP-18 (30–40 μm particle size; 3.9 × 40 × 3.9 mm) guard column	ACN/phosphate buffer (pH 2.4) (30:70, v/v) Flow rate 1.1 mL/min	Isocratic	UV (370 nm)	EtOH + 6 M HCl + H ₂ O (acid hydrolysis)	Quercetin, kaempferol, myricetin.	Total flavonols in tomato juice; flor injection/adsorptive stripping voltametry too.	[71]
Hypersil-ODS column (5 μm particle size; 250 × 4.6 mm id)	ACN/phosphate buffer (pH 2.4) (25:75, v/v) Flow rate 1.2 mL/min	Isocratic	UV (266 nm)	MeOH/1% HCl/TBHQ + 1.2 M HCl (acid hydrolysis)	Quercetin, kaempferol, myricetin.	HPLC–UV, GC–MS analysis of flavonol aglycons in tomato-based products	[72]
Chiralcel OD-RH column (5 μm particle size; 150 × 4.5 mm id)	ACN/H ₂ O/phosphoric acid (30:70:0.04, v/v/v)	Isocratic	UV (292 nm)	MeOH/hexane Enzymatic hydrolysis of the MeOH layer	Naringenin enantiomers, daidzein.	Flavonoids in tomato tissues of various genotypes.	[73]

Table 3. Continued ...

Column	Mobile phase	Elution	Detection	Extraction solvent	Phenolics detected	Observations	Ref.
Chiralcel AD-RH column (5 µm particle size; 150 × 4.5 mm id)	ACN/H ₂ O/phosphoric acid (42:58:0.01, v/v/v)	Isocratic	UV (370 nm)	MeOH/hexane Enzymatic hydrolysis of the MeOH layer	Quercetin, kaempferol, 7-ethoxycoumarin.	Flavonoids in tomato tissues of various genotypes.	[73]

ACN = acetonitrile; EtOH = ethanol; MeOH = methanol; TBHQ = *tert*-butylhydroquinone; TFA = trifluoroacetic acid.

min E levels in heat processed tomato than in the raw product. Cardeñosa *et al.* [66] have proposed a combination of HPLC separation with post-column reaction with phosphomolybdenum reagent at acidic pH as a method of identifying tocopherols in complex extracts. Hexanic sample extracts are desiccated and redissolved in methanol prior to HPLC analysis. The postcolumn formation of the complex was detected at 598 nm with an on-line absorbance detector.

2.3 Phenolic compounds

Several flavonoids have been identified in different tomato varieties. Most of the structures belong to the flavonols, which can be present as aglycones or glycosides. In contrast to fresh tomatoes, most tomato-based products contain significant amounts of free flavonols. According to Stewart *et al.* [68], the flavonol content varies with the tomato variety, size, and country of origin (light is one of the major environmental factors in the synthesis of flavonols). Some 98% of the flavonols detected in 20 fresh tomato varieties were found in the skin and the total content varied from 1.3 to 22.2 mg/kg fw.

The total phenolic content has been analysed spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method with different modifications [22, 40, 51, 52, 60, 65, 69, 70]. In most cases the absorbance is measured around 760 nm and the results expressed as gallic acid equivalents (GAE). A novel approach for a fast screening of total flavonols (quercetin, kaempferol, myricetin) in tomato juice using adsorptive stripping voltammetry in a flow injection system has been described [71]. The proposed method is based on the property of flavonols of being pre-concentrated on carbon paste electrodes where diphenyl ether is used as pasting liquid. The voltammetric peak can be quantified in terms of quercetin equivalent (QE), which is satisfactorily correlated with a weighted sum of the individual concentrations of all three flavonols, as they were determined by LC.

HPLC has been widely used for the separation and determination of polyphenols [23, 55, 57, 59, 28, 68]. Table 3 shows the HPLC conditions for determination of polyphenols in tomato and tomato products. Some of the phenolic compounds detected in tomatoes and tomato-based products have been flavonol aglycones such as quercetin, kaempferol, and myricetin, which have been charac-

terised by HPLC–UV and GC–MS [72], and hydroxycinnamic acids such as caffeic, chlorogenic, ferulic, and *p*-coumaric acids [23, 55, 69, 70]. Solvents such as methanol, ethanol, acetone, and hexane have been used for the extraction of phenolics, often with different proportions of water. A mixture of methanol/water is the most widely used extracting agent, and the water percentage most reported is 50% v/v [55, 68]. The recovery of polyphenols from tomato is also influenced by the extraction time, temperature, and the ratio of solvent-to-sample (R). The most commonly reported extraction period is 2 h [23, 68, 71, 72] at 90°C. Sometimes hydrolysis to release flavonols present as glycosides is carried out simultaneously with the extraction. The samples can be subjected to acid [23, 68, 71, 72] or enzymatic [70, 73] hydrolysis.

2.4 Total antioxidant capacity

As foodstuffs are complex matrices, it is appropriate to measure the total antioxidant capacity of a food to obtain an index of its healthiness [52]. A wide range of assays can be used for assessment of the antioxidant activity of tomato. These methods can be divided into two groups, depending on the oxidising reagent: (i) Methods using organic radical producers (ABTS, DPPH, DMPD, PCL) and (ii) a method utilising metal ions for oxidation (FRAP). Some authors recommend evaluating the antioxidant activity of fruits and vegetables by a number of different methods rather than depending on the results of a single method [74].

The antioxidant activity has been widely analysed using the ABTS assay. This method estimates the relative ability of antioxidant substance to scavenge the radical cation of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS^{•+}) in the aqueous phase. If the antioxidant activity is defined as standard amounts of the synthetic antioxidant Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), the water-soluble vitamin E analogue, the test is called the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. There are different versions of the ABTS assay depending on the antioxidants it measures: hydrophilic, lipophilic or both. One of the tests, which only allows measurement of hydrophilic antioxidants, is based on the oxidation of ABTS in the presence of H₂O₂ and metmyoglobin to the ABTS^{•+} radical cation (blue-green colour), which is photometrically measured at

734 nm [23, 51, 52, 65, 69, 75]. Other tests generate ABTS* radical cation mixing ABTS and potassium persulphate [55, 70] or mixing ABTS, horseradish peroxidase and H₂O₂ [60]. Both assays enable measurement of both kinds of antioxidant by changing the solvent.

The FRAP (ferric reducing ability of plasma) [22, 28, 59, 65] assay had also been employed. At low pH, when a ferric tripyridyltriazine complex is reduced to the ferrous form, an intense blue coloured complex with absorption maximum at 593 nm is formed. FRAP values are obtained by measuring the increase in absorbance at 593 nm caused by the generated ferrous ions in the test reaction mixtures.

In the DPPH assay [23, 40] antioxidants reduce the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, which has an absorption maximum at 515 nm. The antioxidative activity was calculated by determining the decrease in absorbance of the radical when it is reduced.

The principle of the DMPD assay [53, 75] is based on the reduction of the purple radical cation *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine. The absorbance is measured at 505 nm and the antioxidative activity is calculated as in the DPPH assay.

In the PCL assay (photochemiluminiscence) [65], photochemical generation of free radicals is combined with the sensitive chemiluminiscence detection. The antioxidant potential is analysed by means of the lag phase.

Since the overall antioxidant activity of tomato varies considerably according to the genetic variety, growing conditions, ripening stage, and food processing, many different studies taking into account these factors have been carried out. Some examples are presented here. Leonard *et al.* [53] analysed four tomato typologies usually used for fresh consumption in Mediterranean countries. Results showed that cultivar, ripening stage, and growing conditions played a pivotal role in the antioxidant activity and that cherry tomatoes have the highest antioxidative ability. Gahler *et al.* [65] studied the hydrophilic antioxidant capacity of different processed tomato products by using three different methods: TEAC, FRAP, and PCL. These assays showed an increase of the hydrophilic antioxidant activity during the preparation of baked tomatoes, tomato sauce, and tomato soup. On the other hand, Chang *et al.* [40] demonstrated that a different drying process could enhance certain levels of antioxidant activity through the increase of total phenolics, total flavonoids, and lycopene contents. These studies support the theory of a general improvement in bioavailability of individual antioxidants due to their liberation from the matrix when tomato is processed.

3 Concluding remarks

The traditional Mediterranean diet is high in fruit, vegetables, legumes, and whole grains, and includes fish,

nuts, and dairy products having protective health effects. Antioxidants, which are plentiful in Mediterranean diets, are partly responsible for this significant physiological effect on human health. They are claimed to provide protection against a broad range of diseases.

Tomato and tomato products, main components of the Mediterranean diet, are rich in antioxidants and micronutrients and constitute almost the sole available source of lycopene. They are also abundant sources of β -carotene, vitamin C, and phenolic compounds. In general, thermal processing increases the content of bioaccessible antioxidants. Consumers, researchers, and the food industry have increased their interest in, and awareness of, the health benefits of antioxidants from tomatoes.

As a result, many analytical procedures have been applied to the determination of antioxidants in fresh tomato and processed tomato products. The choice of analytical method depends on the particular aim of the analysis and the kind of product analysed. For example, for routine analysis of tomato lycopene, spectrophotometry can be a simple and quick alternative, while the technique of choice for carotenoid composition is HPLC–UV. New methods for determining antioxidant content should be simple, fast, and non-destructive. When no pre-treatment of the sample is required, contamination, losses, isomerisation, or oxidation are limited or completely avoided.

Rather than determining the concentration of each antioxidant individually, evaluation of the total antioxidant activity has become increasingly important. During ripening, the total antioxidant activity (TAA) increases. When tomato is processed, the TAA generally also increases due to liberation of the antioxidants from the matrix.

The antioxidant compounds and their content in tomato are determined by many agronomic, geographical, and seasonal factors in addition to variety. Further studies are required to fully understand the relationship between these factors and the content of antioxidant compounds, the effect that fresh and processed tomatoes have on diet, and their role in promoting health and preventing human disease.

4 References

- [1] Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Polychronopoulos, E., Chrysohou, C., *et al.*, *Med. Sci. Monit.* 2004, 10, RA193–198.
- [2] Trichopoulou, A., Critselis, E., *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13, 453–456.
- [3] Trichopoulou, A., Vasilopoulou, E., Lagiou, A., *Nutri. Rev.* 1999, 57, 253–255.
- [4] Ghiselli, A., D'Amicis, A., Giacosa, A., *Eur. J. Cancer Prev.* 1997, 1, S15–9.
- [5] Bazzano, L. A., Serdula, M. K., Liu, S., *Curr. Atheroscler. Rep.* 2003, 5, 492–499.
- [6] Cardell, M., *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer Verlag, Berlin 1981, 169–197

- [7] Jác, P., Poláček, M., Pospíšilová, M., *J. Pharma. Biomed. Analysis* 2006, 40, 805–814.
- [8] Rajalakhmi, D., Narasimham, S., in: Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K. (Eds), *Food Antioxidants*, Marcel Dekker, New York 1996, p. 65.
- [9] Kaliora, A. C., Dedoussis, G. V. Z., Schmidt, H., *Atherosclerosis* 2006, 187, 1–17.
- [10] Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 883–897.
- [11] Rissanen, T. H., Voutilainen, S., Virtanen, J. K., Venho, B., et al., *J. Nutr.* 2003, 133, 199–204.
- [12] Vainio, H., Weiderpass, E., *Nutr. Cancer* 2006, 54, 111–142.
- [13] Kehrler, J. P., *Crit. Rev. Toxicol.* 1993, 23, 21–48.
- [14] Thomas, M. J., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1995, 35, 21–39.
- [15] Stohs, S. J., *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 1995, 6, 205–228.
- [16] Parr, A. J., Bolwell, G. P., *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 985–1012.
- [17] Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., Galli, C., *Eur. J. Cancer Prev.* 2004, 13, 337–343.
- [18] Giovanucci, E., Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., et al., *J. Nat. Cancer Inst.* 1995, 87, 1767–1776.
- [19] Franceschi, S., Bidoli, E., La Vecchia, C., Talamini, R., et al., *Int. J. Cancer* 1994, 59, 181–184.
- [20] Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., Grolier, P., *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 369–382.
- [21] Periago, M. J., Rincón, F., Agüera, M. D., Ros, G., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 5796–5802.
- [22] George, B., Kaur, C., Khurdiya, D. S., Kapoor, H. C., *Food Chem.* 2004, 84, 45–51.
- [23] Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., Chesson, A., *J. Sci. Food Agric.* 2002, 82, 323–330.
- [24] Shi, J., Le Maguer, M., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2000, 40, 1–42.
- [25] Gartner, C., Stahl, W., Sies, H. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 66, 116–122.
- [26] Clark, R. M., Yao, L., She, L., Furr, H. C., *Lipids* 2000, 35, 803–806.
- [27] Lee, A., Thurnham, D. I., Chopra, M., *Free Radic. Biol. Med.* 2000, 29, 1051–1055.
- [28] Slimestad, R., Verheul, M. J., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7251–7256.
- [29] Buettner, G. R., Jurkiewicz, B. A., in: Cadenas, E., Packer, L. (Eds), *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York 1996, p. 91.
- [30] Davis, A. R., Fish, W. W., Perkins-Veazie, P., *Postharvest Biol. Technol.* 2003, 28, 425–430.
- [31] Davey, M. W., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., et al., *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 825–860.
- [32] Niki, E., in: Cadenas, E., Packer, L. (Eds), *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York 1996, p. 3.
- [33] Naczki, M., Shahidi, F., *J. Pharma. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1523–1542.
- [34] Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., et al., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 837–858.
- [35] Gómez-Caravaca, A. M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *J. Pharma. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1220–1234.
- [36] Arias, R., Lee, T. C., Logendra, L., Janes, H., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1697–1702.
- [37] Kutí, J. O., Konuru, H. B., *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85, 2021–2026.
- [38] Barba, A. I. O., Hurtado, M. C., Mata, M. C. S., Ruiz, V. F., de Tejada, M. L. S., *Food Chem.* 2006, 95, 328–336.
- [39] Sass-Kiss, A., Kiss, J., Milotay, P., Kerek, M. M., Toth-Markus, M., *Food Res. Internat.* 2005, 38, 1023–1029.
- [40] Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., Liu, Y. C., *J. Food Eng.* 2006, 77, 478–485.
- [41] van de Berg, H., Faulks, R., Fernando-Granado, F., Hirschberg, J., et al., *J. Sci. Food Agric.* 2000, 80, 880–912.
- [42] Lin, C. H., Chen, B. H., *J. Chromatogr. A* 2003, 1012, 103–109.
- [43] Taungbodhitham, A. K., Jones, G. P., Wahlqvist, M. L., Briggs, D. R., *Food Chem.* 1998, 63, 577–584.
- [44] Ishida, B. K., Ma, J., Chan, B., *Phytochem. Anal.* 2001, 12, 194–198.
- [45] Kozukue, N., Friedman, M., *J. Sci. Food Agric.* 2003, 83, 195–200.
- [46] Frenich, A. G., Torres, M. E. H., Vega, A. B., Vidal, J. L. M., Bolaños, P. P., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 7371–7376.
- [47] Herrero-Martínez, J. M., Eeltink, S., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., Ramis-Ramos, G., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 660–665.
- [48] Pól, J., Hyötyläinen, T., Ranta-Aho, O., Riekkola, M. L., *J. Chromatogr. A* 2004, 1052, 25–31.
- [49] Rozzi, N. L., Singh, R. K., Vierling, R. A., Watkins, B. A., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2638–2643.
- [50] Sabio, E., Lozano, M., de Espinosa, V. M., Mendes, R. L., et al., *Ind. Eng. Chem. Res.* 2003, 42, 6641–6646.
- [51] Sahlin, E., Savage, G. P., Lister, C. E., *J. Food, Comp. Anal.* 2004, 17, 635–647.
- [52] Molyneux, S. L., Lister, C. E., Savage, G. P., *Internat. J. Food Sci. Nutr.* 2004, 55, 537–545.
- [53] Leonardi, C., Ambrosino, P., Esposito, F., Fogliano, V., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4723–4727.
- [54] Bicanic, D., Fogliano, V., Luterotti, S., Swarts, J., et al., *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85, 1149–1153.
- [55] Re, R., Bramley, P. M., Rice-Evans, C., *Free Radical Res.* 2002, 36, 803–810.
- [56] Burns, J., Fraser, P. D., Bramley, P. M., *Phytochem.* 2003, 62, 939–947.
- [57] Raffo, A., Leonardi, C., Fogliano, V., Ambrosino, P., et al., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6550–6556.
- [58] Seybold, C., Fröhlich, K., Bitsch, R., Otto, K., Böhm, V., *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7005–7010.
- [59] Slimestad, R., Verheul, M. J., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3114–3119.
- [60] Cano, A., Acosta, M., Arnao, M. B., *Postharvest Biol. Tech.* 2003, 28, 59–65.
- [61] Wei, Y., Zhang, T., Xu, G., Ito, Y., *J. Chromatogr. A*, 2001, 929, 169–173.
- [62] Tiziani, S., Schwartz, S. J., Vodovotz, Y., *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 6094–6100.
- [63] Bicanic, D., Swarts, J., Luteroti, S., Helander, P., et al., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 3295–3299.
- [64] Galiana-Balaguer, L., Roselló, S., Herrero-Martínez, J. M., Maquieira, A., Nuez, F., *Anal. Biochem.* 2001, 296, 218–224.
- [65] Gahler, S., Otto, K., Böhm, V., *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7962–7968.
- [66] Cardeñosa, R., Mohamed, R., Pineda, M., Aguilar, M., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3390–3395.
- [67] Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., Eitenmiller, R. R., *J. Food Composition Anal.* 2006, 19, 196–204.
- [68] Stewart, A. J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G. I., et al., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 2663–2669.
- [69] Minoggio, M., Bramati, L., Simonetti, P., Gardana, C., et al., *Ann. Nutr. Metab.* 2003, 47, 64–69.
- [70] Spencer, J. P. E., Kuhnle, G. G. C., Hajirezaei, M., Mock, H. P., et al., *Free Rad. Res.* 2005, 39, 1005–1016.
- [71] Volikakis, G. J., Efstathiou, C. E., *Anal. Chim. Acta.* 2005, 551, 124–131.
- [72] Tokusoglu, Ö., Ünal, M. K., Yildirim, Z., *Acta Chromatographica*, 2003, 13, 196–207.
- [73] Torres, C. A., Davies, N. M., Yañez, J. A., Andrews, P. K., *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 95363–9543.
- [74] Schlesier, K., Hartwat, M., Böhm, V., Bitsch, R., *Free Radical Res.* 2002, 36, 177–187.
- [75] Scalfi, L., Fogliano, V., Pentangelo, A., Graziani, G., et al., *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1363–1366.

CAPÍTULO 5

ESTUDIO DEL PERFIL METABÓLICO Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN EXTRACTOS METANÓLICOS DE TOMATE

Se ha visto como el tomate destaca en la dieta por sus propiedades nutricionales y comerciales. Aunque se cultiva y cocina como una verdura, botánicamente es una fruta perteneciente a la familia de las solanáceas, que incluye otros cultivos como la patata, el pimiento, la berenjena, el tabaco o la petunia.

En España se producen más de 4 millones de toneladas de tomate al año, de las cuales cerca del 35% proviene de los invernaderos de la provincia de Almería (*figura 5.1.a*). Sin embargo, y hasta el momento, son escasos los estudios acerca de la composición de las distintas variedades de tomate producidas en dicha provincia.

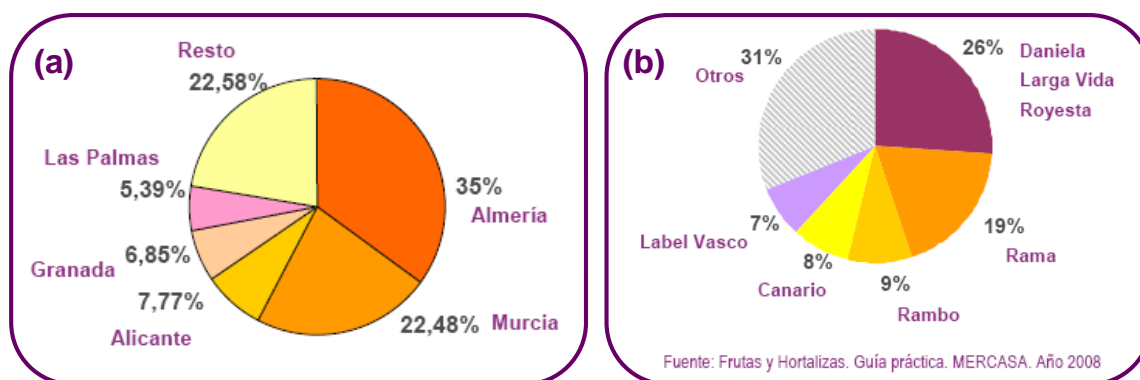


Figura 5.1. (a) Distribución geográfica de la producción del tomate y (b) ventas por variedad en el año 2008 en España¹⁵⁹

¹⁵⁹ Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino 2010
http://www.mapa.es/ministerio/pags/observatorio/pdf/estudios/Estudio_Tomate.pdf

Por otro lado, nuestro grupo de investigación participa en un convenio de colaboración con la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía para la realización de estudios experimentales sobre parámetros de calidad nutricional y funcional de hortalizas y frutas de alto consumo, lo cual otorgará un valor añadido al producto y permitirá, además, ampliar, mejorar y actualizar las tablas españolas de composición de alimentos, que actualmente carecen del contenido en antioxidantes.

En este trabajo se ha analizado el extracto metanólico de tres variedades de tomate producidas en Almería: Daniela, Rambo y Raf. Estas tres variedades se seleccionaron por sus características distintivas:

- ❖ Daniela y Rambo son dos de las variedades más consumidas en España (**figura 5.1.b**). El tomate Daniela es rojo, de textura suave y muy jugoso. Es una variedad larga vida, por lo que no necesita refrigeración. El tomate Rambo es de mayor tamaño, de sabor intenso y muy usado en ensaladas.
- ❖ Por otro lado, la variedad Raf es cultivada en muy pocas regiones a nivel comercial (entre ellas la provincia de Almería) ya que madura y se deteriora muy rápido. Esta variedad tiene la superficie asurcada, es de color verde intenso y rojo en la base. Sobresale por su especial sabor, ácido y dulce a la vez.

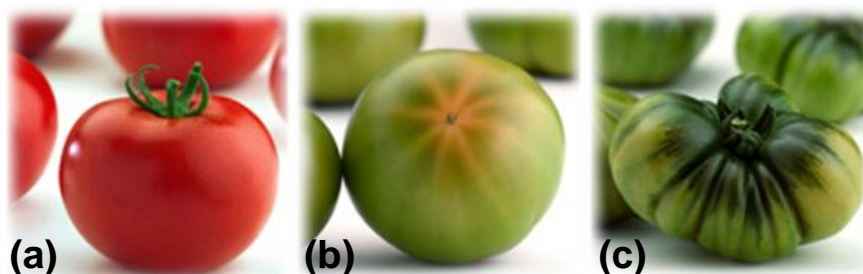


Figura 5.2. Variedades de tomate analizadas: (a) Daniela, (b) Rambo y (c) Raf

El consumo de tomate y de sus productos se ha relacionado con efectos beneficiosos sobre la salud, y estas propiedades saludables se han atribuido tradicionalmente a su contenido en compuestos con carácter antioxidantes (ver capítulo 4). Sin embargo, el tomate acumula un gran número de metabolitos y, posiblemente, las interacciones de todos ellos sean las verdaderas responsables de los beneficios derivados de su consumo.

Por esta razón hemos realizado el estudio en profundidad del perfil metabólico completo de las tres variedades de tomate seleccionadas (el extracto se hizo utilizando el fruto completo, piel y semillas incluidas), utilizando HPLC acoplada a distintos detectores

(DAD, ESI-TOF y ESI-IT), para así asegurar la identificación del mayor número posible de metabolitos. La combinación de la información obtenida con los distintos detectores (tiempo de retención, espectro UV-Vis, masa exacta, distribución isotópica, fragmentaciones, en polaridad negativa y positiva), con los datos disponibles en bibliografía, las bases de datos existentes en internet de libre acceso y los patrones disponibles en el laboratorio, permitieron la identificación tentativa de 135 metabolitos pertenecientes a 6 familias de compuestos diferentes (aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, compuestos fenólicos, triterpenoides y ácidos grasos). De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, 21 de dichos metabolitos (en su mayoría ácidos grasos) no se habían descrito antes en el fruto del tomate.

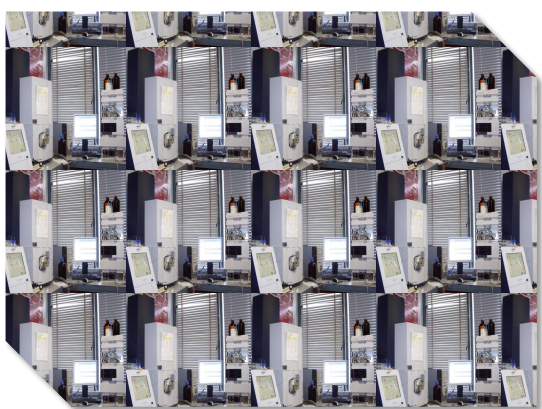


Figura 5.3. Sistema HPLC-ESI-DAD-TOF empleado para la identificación de metabolitos en tomate

Los metabolitos más abundantes en el extracto metanólico de las variedades de tomate analizadas fueron los compuestos fenólicos; en la variedad Daniela se identificaron 61, incluyendo 2 alcoholes fenólicos, 30 ácidos hidroxicinámicos, 6 benzoicos, 4 fenilacéticos y 19 flavonoides, en la mayoría de los casos en forma glucosada. En las otras dos variedades se detectó un número ligeramente inferior de compuestos fenólicos.

Por todo lo expuesto en relación a esta clase de metabolitos secundarios de las plantas, se hizo un estudio cuantitativo de los mismos en las tres variedades de tomate. El método, utilizando ESI-TOF en polaridad negativa, fue validado y empleado en la cuantificación; al no existir estándares comerciales para la mayoría de compuestos identificados, se emplearon como patrones compuestos pertenecientes a la misma familia. Se pudo hacer así una estimación de la abundancia de cada compuesto y familia en las distintas variedades, destacando en todas ellas los ácidos hidroxicinámicos (y entre ellos, el ácido cafeoilquínico con sus distintos isómeros), seguidos de los fenilacéticos. Este hecho resultó sorprendente, ya que, en pocas publicaciones anteriores se ha descrito la presencia

de esta clase de ácidos fenólicos en tomate¹⁶⁰. Con respecto a los flavonoides, la mayoría pertenece a la familia de los flavonoles (en concreto, derivados de la quercetina). Los mayores niveles de compuestos fenólicos se detectaron en la variedad Daniela.

Los datos relativos al contenido de compuestos fenólicos en tomate ayudarán a definir más claramente las propiedades de cada variedad y a evaluar su potencial como fuente de antioxidantes fenólicos, pudiendo incluirse en las tablas españolas de composición de alimentos.

Este trabajo se ha publicado en la revista *Phytochemistry* bajo el título “**Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit**”.

¹⁶⁰ Helmja, K., Vaher, M., Püssa, T., Raudsepp, P., Kaljurand, M. *Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanum lycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*, *Electrophoresis* 2008, 29, 3980-3988.



Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit

María Gómez-Romero*, Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez**

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, c/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2010

Received in revised form 30 July 2010

Keywords:

Solanum esculentum

Solanaceae

Tomato

Metabolite profiling

Phenolic compound

Quantification

HPLC-DAD-ESI-MS

ABSTRACT

The consumption of tomatoes and tomato products has been associated with a reduction in the risk of contracting some types of cancer and other chronic diseases. These beneficial properties may be attributed to the presence of key metabolites and the interactions among them. We have developed and validated an analytical method for the comprehensive profiling of semi-polar metabolites in the methanol extract of three cultivars of raw tomatoes (Daniela, Raf and Rambo) grown in Almería, in south-east Spain. Diode-array and time-of-flight/ion-trap mass spectrometry detectors were used to ensure the wide detection of metabolites with highly divergent properties. The masses thus detected were assigned by matching their accurate mass-signals with tomato compounds reported in the literature, and supplemented by UV and MS/MS information, reference compounds and existing metabolite databases. In this way we were able to identify tentatively 135 compounds belonging to various structural classes, 21 of which are to our knowledge reported for the first time in the tomato fruit. Among the metabolites identified, the most abundant were phenolic compounds. This class of secondary metabolites is attracting considerable attention from producers and consumers due to their antioxidant activity and nutritional properties. Their quantitative analysis was achieved by using closely related derivatives for each family.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fruit and vegetables are of great importance in the human diet, providing as they do a major source of bioactive substances. Among these, the tomato (*Solanum esculentum*) stands out for its commercial and nutritional properties. Tomato consumption either as fresh fruit or in processed products is higher than that of all other fruits and vegetables, due in part to their year-round availability and accessible prices. More than 129 million tons were produced worldwide in the year 2008 (FAO STAT, 2010), of which about 4 million tons were grown in Spain. Nearly 35% of Spanish tomatoes are grown in plastic greenhouses in Almería (Ministry of Environmental, Agrarian and Marine Sectors of Spain, 2010). Nevertheless, studies to date on the chemical composition of the different tomato cultivars in Almería have been scarce (Guil-Guerrero and Rebollosa-Fuentes, 2009).

Tomato consumption has been related to a reduced likelihood of several chronic diseases, including cardiovascular disease (Willcox et al., 2003) and certain cancers (Giovannucci, 1999). These health benefits have been widely attributed to their containing key antioxidants such as carotenoids, vitamins and phenolic

compounds (Gómez-Romero et al., 2007). Nevertheless, tomatoes accumulate several kinds of metabolites, and interactions amongst these may possibly be responsible for the health benefits deriving from their consumption. Metabolites are the end products of cell regulatory processes and their levels can be regarded as the ultimate response of biological systems to genetic or environmental changes (Fiehn, 2002). The metabolite composition of fresh tomatoes can vary between the tissues of a single fruit (Moco et al., 2007; Mounet et al., 2007; Peng et al., 2008) and between different tomatoes, according to the cultivar in question, its cultivation conditions, such as light, temperature, soil, fertilisation and ripeness at harvest, and handling and storage methods (Davies and Hobson, 1981; Dorais et al., 2008; Dumas et al., 2003; Gautier et al., 2008; Schindler et al., 2005; Slimestad and Verheul, 2009).

Metabolites are classified into primary and secondary, though the boundaries between these groups can sometimes be blurred (Hounsome et al., 2008). Primary metabolites, such as organic acids, fatty acids, nucleotides and amino acids, play essential roles in growth and development, respiration and photosynthesis and hormone and protein synthesis. Secondary metabolites, including phenolic acids, flavonoids and terpenoids, play key roles in protecting plants from herbivores, microorganisms and UV radiation, in attracting pollinators or seed-dispersing animals and acting as stress-condition signalling molecules, among other important functions (Crozier et al., 2006). The science of metabolomics is designed to identify and quantify all the metabolites in a biological

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248593; fax: +34 958 249510.

** Corresponding author. Tel.: +34 958 243297; fax: +34 958 249510.

E-mail addresses: mgromero@ugr.es (M. Gómez-Romero), albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

system (Fiehn, 2002) and so contribute to our understanding of the complex molecular interactions within biological systems (Rochfort, 2005). Over the last decade several comprehensive metabolomic approaches using different analytical techniques have been established to identify the similarities and differences among tomato varieties and their tissue types (Adato et al., 2009; Dunn et al., 2005; Mintz-Oron et al., 2008; Peng et al., 2008), to explore alterations in mutant or transgenic lines (Le Gall et al., 2003; Long et al., 2006), to investigate the changes that occur during fruit development and ripening (Carrari et al., 2006; Mounet et al., 2007) and the effects of processing (Capanoglu et al., 2008). Moco et al. (2006) and Iijima et al. (2008a) have used similar strategies to screen tomato metabolites. Both have created different metabolome databases to facilitate the systematic identification of unknown metabolites in the tomato by using liquid-chromatography mass spectrometry, either employing quadruple-time-of-flight (Moco et al., 2006) or Fourier transform ion-cyclotron resonance (Iijima et al., 2008a).

The aim of our study is the comprehensive characterisation of the methanol extract of three tomato cultivars grown in Almería. To ensure the identification of various structural classes we used liquid chromatography coupled to multiple detection systems: diode-array detection (DAD) in parallel with electrospray ionisation (ESI)-ion-trap (IT) and time-of-flight (TOF) mass spectrometry to obtain complementary data for the compounds detected. Among the different classes of metabolite found, the most abundant were

phenolic compounds. The bioavailability and biological effects of this class of secondary metabolites are attracting considerable attention from health, food and nutrition groups because of their antioxidant and free-radical-scavenging activities (Fernández-Pancho et al., 2008; Heim et al., 2002; Miller and Ruiz-Larrea, 2002). In general, phenolic compounds contribute to the organoleptic, nutritional and pharmacological properties of tomatoes and tomato products. We have made a quantitative analysis of these bioactive metabolites, which we hope will help to define tomato properties more clearly, assess the potential of the tomato as a source of phenolic antioxidants and possibly lead to an updating of the Spanish food composition tables.

2. Results and discussion

2.1. Profiling metabolites in the methanol extract of the tomato

Tomatoes contain thousands of widely diverse metabolites, each found in varying concentrations, which challenges the capacity of extraction protocols to capture the majority of them. Within this context we used a reproducible, unselective extraction protocol using methanol as extraction solvent. This solvent was able to successfully extract polar and semi-polar metabolites of great interest. Each sample was extracted three times to assure high recovery levels. A pre-concentration step was needed to obtain detectable levels of all the compounds extracted.

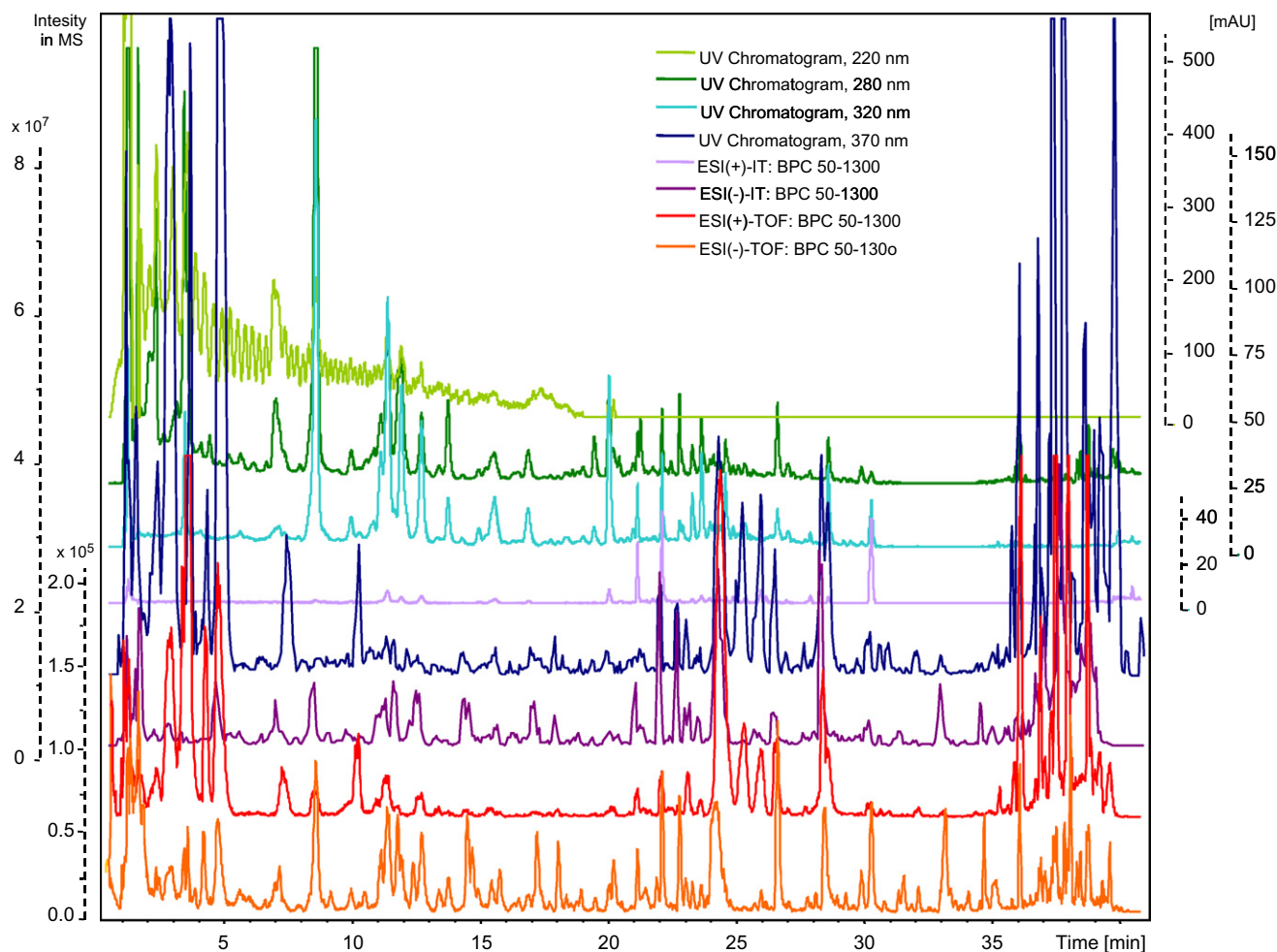


Fig. 1. Profiles of the methanol extract of the Daniela tomato cultivar with the different detectors employed: base peak chromatograms (BPC) obtained with TOF and IT mass spectrometers in both negative and positive-ion modes and UV chromatograms at different wavelengths, according to the absorption maxima of the different metabolite families detected. Scales are in a different order of magnitude for an easier visualisation of the peaks.

After testing several gradients, flow rates and temperatures, the chromatographic conditions chosen were a compromise between resolution and retention time, and resulted in an acceptable and an adequate separation of the different metabolite classes, including several isomeric forms. Retention time, as an indication of polarity, allowed us to predict the class of metabolite according to the region in which each family eluted in the chromatographic separation. As expected for reversed-phase chromatography, the more polar the metabolites the earlier they eluted. Certain tendencies in the elution order were observed: if the compound contained apolar substituents, such as methoxy groups, retention time increased, but if they included sugars or quinic-acid residues they tended to elute before their corresponding free compound.

Multiple detectors and detection modes were used to ensure the identification of metabolites with highly divergent properties.

We chose the cultivar Daniela to show the characterisation of the metabolites carried out in this study. The metabolic profiles of this cultivar as examined with the different detectors used (TOF-MS and IT-MS in both polarities, and UV at different wavelengths) are set out in Fig. 1. The intensity of the mass-signal and absorbance scales are not depicted in the same order of magnitude in all the chromatograms to facilitate the distinction of all the peaks.

Metabolite assignments were made by comparing retention time, UV/Vis spectra and MS data (accurate mass, isotopic distribution and fragmentation pattern in both positive- and negative-ion modes) of the compounds detected with the tomato compounds reported in literature and searching in the existing on-line public databases (PubChem <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>, Kegg

Ligand Database <<http://www.genome.jp/kegg/ligand.html>>, Metlin <<http://metlin.scripps.edu/>>, MassBank <<http://www.massbank.jp/>>, SciFinder Scholar <<https://scifinder.cas.org/>>). Identifications were confirmed with standard compounds whenever available in-house. Phenolic compound standards were used not only for confirming but also for validating the method and quantitative analyses.

The assignment of the metabolites can be seen in Fig. 2, which shows the HPLC-ESI(-)-TOF-MS base peak chromatogram (BPC), the HPLC gradient (how the percentage of acetonitrile changes during analysis time) and the elution areas of the different metabolite classes (in accordance with the compounds identified in the Daniela extract) together with a representative structure of each class. We were able to identify tentatively a total of 135 compounds belonging to various metabolite classes, including organic acids, amino acids, nucleosides, phenolic acids (hydroxybenzoic, hydroxycinnamic and phenylacetic acids), phenolic alcohols, flavonoids, fatty acids and triterpenoid glycosides. The values not indicating a peak are compounds existing at trace levels or in smaller quantities than a coeluting compound. Some of the peaks detected could not be identified and have not been labelled since they are few in number compared to the total number of identifications.

An overview of all the compounds identified in the methanol extract by TOF-MS in the negative-ion mode is given in Table 1, except for the triterpenoid glycosides, which are set out in Table 2. The compounds in Table 1 are grouped by metabolite class, where the peak number has been assigned according to the overall elution order, and includes retention time, absorbance maxima in the UV/Vis range (undetectable absorbance is represented

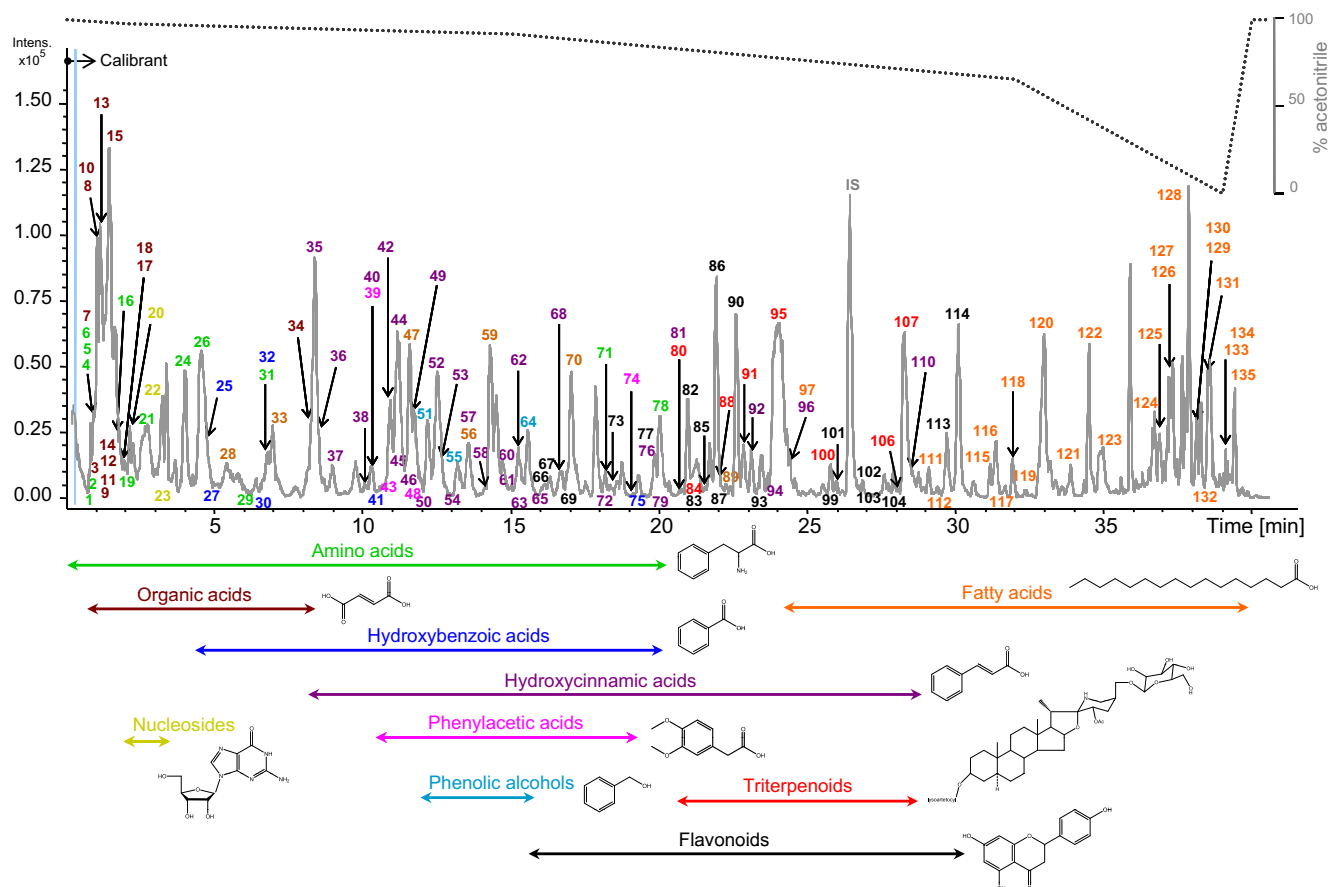


Fig. 2. BPC of Daniela variety obtained by HPLC-ESI-TOF-MS in the negative-ion mode. Peak labelling designates the identified compounds. Numbers not indicating a specific peak are signals either close to baseline or coeluting with more intense signals. The elution areas and a representative structure of each metabolite class are indicated. Acetonitrile % gradient is also shown.

Table 1

Peak assignment of the Daniela tomato methanol extract using HPLC-DAD-ESI(-)-TOF-MS presented according to the class of metabolite that the compounds belong to.

Peak ^a	LC RT (min)	DAD UV bands (nm) ^b	ESI(-) TOF					Assignment	
			Experimental Acc. Mass [M-H] ⁻	CID in MS spectra ^c	Error (mDa)	mSigma value	Formula for the detected [M-H] ⁻	Tentative identification	References ^d
<i>Amino acids and derivatives</i>									
1	0.91	218	132.0308	-	-0.52	1.9	C ₄ H ₆ NO ₄	Aspartic acid	Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005) and Le Gall et al. (2003)
2	0.94	220	104.0339	-	1.37	21.2	C ₃ H ₆ NO ₃	Serine	Adato et al. (2009) Dunn et al. (2005) and Le Gall et al. (2003)
4	0.99	219, 266	146.0466	128.0368 [M-H-H ₂ O] ⁻	-0.75	6.2	C ₅ H ₈ NO ₄	Glutamic acid ⁺	Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Moco et al. (2008) and Mounet et al. (2007)
5	1.01	220, 264	102.0549	-	1.20	7.3	C ₄ H ₈ NO ₂	γ-Aminobutyric acid (GABA)	Adato et al. (2009), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Moco et al. (2008) and Mounet et al., 2007
6	1.02	220, 264	308.0985	290.0862 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 146.0460 [M-H-hex] ⁻	0.21	10.8	C ₁₁ H ₁₈ NO ₉	Fructosyl glutamate	Davidek et al. (2005)
16	1.68	218, 262	128.0355	-	-0.20	17.2	C ₅ H ₆ NO ₃	Pyroglutamic acid ⁺	Dunn et al. (2005), Marconi et al. (2007) and Mounet et al. (2007)
19	2.08	219, 263	180.0666	163.0401 [M-H-NH ₃] ⁻	-0.01	7.7	C ₉ H ₁₀ NO ₃	Tyrosine	Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Moco et al. (2008) and Mounet et al. (2007)
21	2.71	219, 273sh	292.1392	202.1065 [M-H-90] ⁻ , 130.0868 [M-H-hex] ⁻	1.03	5.6	C ₁₂ H ₂₂ NO ₇	Fructosyl leucine/isoleucine	Davidek et al. (2005)
24	4.03	217, 254sh	164.0712	147.0440 [M-H-NH ₃] ⁻	0.54	7.6	C ₉ H ₁₀ NO ₂	DL-Phenylalanine ⁺	Buescher et al. (2010), Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Mounet et al. (2007) and Moco et al. (2007, 2008)
26	4.59	216, 260	326.1237	236.0907 [M-H-90] ⁻ , 164.0704 [M-H-hex] ⁻	0.85	6.7	C ₁₅ H ₂₀ NO ₇	Fructosyl phenylalanine	Davidek et al. (2005)
29	6.58	219	116.0714	-	0.34	35.6	C ₅ H ₁₀ NO ₂	Valine	Adato et al. (2009), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Moco et al. (2008) and Mounet et al. (2007)
31	6.86	219, 279sh	203.0825	-	0.08	38.3	C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂	Tryptophan	Adato et al. (2009), Buescher et al. (2010), Le Gall et al. (2003) and Mintz-Oron et al. (2008)
71	18.16	227	186.1135	142.1198 [M-H-CO ₂] ⁻	0.06	17.3	C ₉ H ₁₆ NO ₃	Amino oxononanoic acid	-
78	19.98	224, 279sh	245.0920	203.0814 [M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	1.19	11.2	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₃	Acetyl tryptophan	-
<i>Organic acids and derivatives</i>									
3	0.97	212, 219	195.0509	-	0.17	16.0	C ₆ H ₁₁ O ₇	Gluconic acid/galactonic acid	Adato et al. (2009) and Mintz-Oron et al. (2008)
7	1.02	200, 264	191.0552	-	0.26	13.1	C ₇ H ₁₁ O ₆	Quinic acid ⁺	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008) and Morvai and Molnar-Perl (1992)
8	1.07	229sh, 251	115.0036	-	0.12	7.8	C ₄ H ₃ O ₄	Fumaric acid ⁺	Adato et al. (2009), Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005), Marconi et al. (2007) and Mounet et al. (2007)
9	1.09	229sh, 252	89.0214	-	3.03	19.1	C ₃ H ₅ O ₃	Oxalic acid	Buescher et al. (2010) and Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes (2009)
10	1.09	229sh, 253	133.0176	115.0034 [M-H-H ₂ O] ⁻	0.04	5.7	C ₄ H ₅ O ₅	Malic acid ⁺	Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Marconi et al. (2007), Morvai and Molnar-Perl (1992) and Mounet et al. (2007)
11	1.09	229sh, 254	175.0244	-	0.37	17.0	C ₆ H ₇ O ₆	Ascorbic acid ⁺	Dunn et al. (2005), Helmja et al. (2008), Moco et al. (2007, 2008) and Morvai and Molnar-Perl (1992)
12	1.17	222, 254sh	173.0088	-	0.41	146.5	C ₆ H ₅ O ₆	<i>t</i> -Aconitic acid ⁺	Buescher et al. (2010) and Marconi et al. (2007)
13	1.19	222, 257sh	191.0195	173.0084 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 111.0086 [M-H-CO ₂ -2H ₂ O] ⁻	0.20	2.1	C ₆ H ₇ O ₈	Isocitric acid	Morvai and Molnar-Perl (1992)
14	1.46	219, 261	87.0059	-	2.90	19.5	C ₃ H ₃ O ₃	Pyruvic acid ⁺	Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005) and Marconi et al. (2007)
15	1.49	219, 261	191.0195	173.0092 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 111.0087 [M-H-CO ₂ -2H ₂ O] ⁻	0.26	1.6	C ₆ H ₇ O ₇	Citric acid ⁺	Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005), Le Gall et al. (2003), Marconi et al. (2007), Moco et al. (2008), Morvai and Molnar-Perl (1992) and Mounet et al. (2007)
17	1.98	219, 262	147.0296	-	0.30	10.0	C ₅ H ₇ O ₅	Citramalic acid ⁺	Marconi et al. (2007)

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak ^a	LC RT (min)	DAD UV bands (nm) ^b	ESI(-) TOF		Error (mDa)	mSigma value	Formula for the detected [M-H] ⁻	Assignment	
			Experimental Acc. Mass [M-H] ⁻	CID in MS spectra ^c				Tentative identification	References ^d
18	2.03	218, 263	117.0184	-	0.29	22.1	C ₄ H ₅ O ₄	Succinic acid ^e	Adato et al. (2009), Buescher et al. (2010), Dunn et al. (2005) and Mintz-Oron et al. (2008)
34	8.37	219, 290	175.0605	115.0385 [M-H-2CH ₃] ⁻	0.74	0.9	C ₇ H ₁₁ O ₅	Isopropylmalic acid	Buescher et al. (2010)
<i>Nucleosides</i>									
20	2.18	218, 261	243.0613	200.0555 [M-H-CHNO] ⁻ , 111.0165 [M-H-pent] ⁻	1.00	4.9	C ₉ H ₁₁ N ₂ O ₆	Uridine	Buescher et al. (2010) and Le Gall et al. (2003)
22	3.27	218, 255	282.0822	150.0415 [M-H-pent] ⁻	2.22	3.0	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₅	Guanosine	Le Gall et al. (2003)
23	3.42	218, 256	266.0899	134.0473 [M-H-pent] ⁻	-0.38	2.2	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₄	Adenosine	Le Gall et al. (2003) and Moco et al., 2008
<i>Hydroxybenzoic acids and derivatives</i>									
25	4.07	217, 249sh	299.0758	137.0240 [M-H-hex] ⁻	1.46	3.9	C ₁₃ H ₁₅ O ₈	Hydroxybenzoic acid hexose	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006) and Morvai and Molnar-Perl (1992)
27	5.07	219, 260, 292	153.0190	109.0286 [M-H-CO ₂] ⁻	0.33	31.5	C ₇ H ₅ O ₄	Protocatechuic acid ^e	Moco et al. (2006)
30	6.83	219, 293	153.0187	109.0270 [M-H-CO ₂] ⁻	0.65	27.6	C ₇ H ₅ O ₄	Gentic acid ^e	-
32	6.95	220, 280	285.0616	153.0185 [M-H-pent] ⁻	-0.04	13.8	C ₁₂ H ₁₃ O ₈	Dihydroxybenzoic acid pentose	-
41	10.78	219, 292	121.0280	-	0.58	21.6	C ₇ H ₅ O ₂	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	Schindler et al. (2005)
75	19.70	232, 283	121.0288	-	0.67	55.3	C ₇ H ₅ O ₂	Benzoic acid	Adato et al. (2009)
<i>Hydroxycinnamic acids and derivatives</i>									
35	8.39	220, 292	341.0869	179.0335 [M-H-hex] ⁻ , 135.0446 [M-H-hex-CO ₂] ⁻	0.89	5.1	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Caffeoyl-hexose I	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)
36	8.47	220, 292	325.0915	163.0394 [M-H-hex] ⁻	1.35	1.1	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	Coumaric acid hexose	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)
37	9.81	219, 257, 327	341.0869	281.0646 [M-H-2CHOH] ⁻ , 251.0529 [M-H-3CHOH] ⁻	0.95	4.0	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Caffeoyl-hexose II	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)
38	10.08	219, 304	353.0861	191.0442 [quin-H] ⁻	1.68	16.4	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	1-Caffeoylquinic acid	-
40	10.31	219, 277	327.1070	165.0552 [M-H-hex] ⁻	1.52	12.1	C ₁₅ H ₁₉ O ₈	3-(2-Hydroxyphenyl)propanoic acid hexose	-
42	10.91	219, 315	341.0868	179.0345 [M-H-hex] ⁻ , 135.0422 [M-H-hex-CO ₂] ⁻	1.03	6.8	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Caffeoyl-hexose III	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)
44	11.20	219, 294, 321	353.0869	707.1768 [2M-H] ⁻ , 191.0555 [quin-H] ⁻	0.95	48.2	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	3-Caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) ^e	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008), Le Gall et al. (2003), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Mounet et al. (2007)
45	11.30	219, 318	355.1020	193.0502 [M-H-hex] ⁻	1.47	5.9	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	Ferulic acid hexose I	Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)
46	11.50	219, 284, 321	341.0870	281.0631 [M-H-2CHOH] ⁻ , 251.0534 [M-H-3CHOH] ⁻	0.85	16.7	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Caffeoyl-hexose IV	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)
49	11.72	219, 295sh, 320	179.0341	135.0452 [M-H-CO ₂] ⁻	0.88	9.4	C ₉ H ₇ O ₄	Caffeic acid ^e	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006)
50	11.83	220, 309	325.0918	163.0399 [M-H-hex] ⁻	1.05	28.0	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	Coumaroyl-hexose	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)
52	12.50	220, 293sh, 325	353.0870	191.0523 [quin-H] ⁻ , 179.0344 [caff-H] ⁻ , 173.0447 [quin-H-H ₂ O] ⁻ , 135.0438 [caff-H-CO ₂] ⁻	0.80	3.7	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	5-Caffeoylquinic acid	Adato et al. (2009);, Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)
53	13.22	221, 277, 313sh	357.1188	195.0657 [M-H-hex] ⁻	0.31	6.9	C ₁₆ H ₂₁ O ₉	3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)propanoic acid hexose	-
54	13.28	220, 281	325.0918	-	0.31	27.2	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	Coumaric acid hexose /coumaroyl-hexose	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)
57	13.57	222, 298	385.1134	-	0.63	11.5	C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀	Sinapic acid hexose	-

58	14.16	220, 301	341.0872	179.0357 [M-H-hex] ⁻	0.62	21.7	C ₁₅ H ₁₇ O ₉	Dihydroxycinnamic acid hexose	-	
60	14.74	223	355.1040	-	-0.58	21.6	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	Feruloyl-hexose I	Moco et al. (2006, 2007)	
61	14.98	221	355.1044	193.0493 [MvH-hex] ⁻	-0.95	18.4	C ₁₆ H ₁₉ O ₉	Feruloyl-hexose II	Moco et al. (2006, 2007)	
62	15.26	220, 313	353.0877	191.0552 [quin-H] ⁻	0.06	16.3	C ₁₆ H ₁₇ O ₉	4-Caffeoylquinic acid	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)	
63	15.31	220, 309	337.0944	191.0571 [quin-H] ⁻	-1.53	21.2	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	Coumaroylquinic acid I	Moco et al. (2006)	
65	16.07	223, 294	337.0928	-	0.14	23.3	C ₁₆ H ₁₇ O ₈	Coumaroylquinic acid II	Moco et al. (2006)	
68	16.65	223, 309	163.0394	119.0493 [M-H-CO ₂] ⁻	0.70	8.3	C ₉ H ₇ O ₃	<i>p</i> -Coumaric acid ⁺	Buescher et al. (2010), Moco et al. (2006) and Schindler et al. (2005)	
72	18.22	223, 292	367.1042	191.0565 [quin-H] ⁻	-0.72	18.3	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	Feruloylquinic acid I	Moco et al. (2006)	
76	19.81	232, 291sh, 323	193.0506	178.0265 [M-H-CH ₃] ⁻ , 134.0373 [M-H-CH ₃ -CO ₂] ⁻	0.04	7.5	C ₁₀ H ₉ O ₄	Ferulic acid ⁺	Moco et al. (2006) and Schindler et al. (2005)	
79	20.27	233, 276	367.1035	191.0553 [M-H-fer] ⁻	-0.01	20.5	C ₁₇ H ₁₉ O ₉	Feruloylquinic acid II	Moco et al. (2006)	
81	20.75	234	193.0504	134.0363 [M-H-CH ₃ -CO ₂] ⁻	0.27	8.5	C ₁₀ H ₉ O ₄	Isoferulic acid	-	
92	23.04	238, 298sh, 321	515.1193	-	0.17	7.0	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	Dicaffeoylquinic acid I	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)	
94	23.44	238, 299sh, 323	515.1188	353.0880 [M-H-162(caff-H ₂ O)] ⁻ , 191.0534 [quin-H] ⁻ , 179.0348 [caff-H] ⁻	0.67	11.4	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	Dicaffeoylquinic acid II	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)	
96	24.38	240, 295sh, 327	515.1198	353.0880 [M-H-162(caff-H ₂ O)] ⁻ , 191.0534 [quin-H] ⁻ , 179.0348 [caff-H] ⁻	-0.32	21.9	C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂	Dicaffeoylquinic acid III	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)	
110	28.35	242, 299sh, 326	677.1494	515.1204 [M-H-162(caff-H ₂ O)] ⁻ , 353.0845 [quin-H] ⁻ , 179.0374 [caff-H] ⁻	1.79	26.7	C ₃₄ H ₂₉ O ₁₅	Tricaffeoylquinic acid	Adato et al. (2009) Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)	
<i>Phenylacetics acids and derivatives</i>										
39	10.29	219, 276	343.1033	181.0498 [M-H-hex] ⁻	0.17	10.7	C ₁₅ H ₁₉ O ₉	Homovanillic acid hexose I	Helmja et al. (2008)	
43	11.13	219, 294, 324	343.1020	181.0493 [M-H-hex] ⁻	1.45	15.8	C ₁₅ H ₁₉ O ₉	Homovanillic acid hexose II	Helmja et al. (2008)	
48	11.70	219, 286, 320	343.1032	-	0.23	20.4	C ₁₅ H ₁₉ O ₉	Homovanillic acid hexose III	Helmja et al. (2008)	
74	18.56	227, 279	195.0653	136.0510 [M-H-CH ₃ -CO ₂] ⁻ , 121.0301 [M-H-2CH ₃ -CO ₂] ⁻	0.95	13.2	C ₁₀ H ₁₁ O ₄	Homoveratric acid	-	
<i>Phenolic alcohol derivatives</i>										
51	12.22	219, 300	431.1544	-	1.49	12.5	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₁	Benzyl alcohol dihexose I	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006)	
55	13.29	219, 276	431.1545	-	1.38	5.1	C ₁₉ H ₂₇ O ₁₁	Benzyl alcohol dihexose II	Moco et al. (2006)	
64	15.55	223, 312	401.1448	-	0.52	2.6	C ₁₈ H ₂₅ O ₁₀	Benzyl alcohol hexose-pentose	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006)	
<i>Flavonoids and glycosides</i>										
66	16.10	223, 289	595.1665	355.1008 [M-H-240] ⁻	0.36	14.0	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	Naringenin dihexose I	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a,b), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006)	
67	16.28	223, 284	595.1642	355.1035 [M-H-240] ⁻	2.66	12.3	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	Naringenin dihexose II	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a,b), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006)	
69	16.70	223, 309	771.1978	609.2233 [M-H-hex] ⁻	1.16	12.2	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₁	Rutin hexoside (quercetin dihexose-deoxyhexose)	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007)	
73	18.34	227, 276	473.1665	431.1520 [M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	-0.04	21.1	C ₂₁ H ₂₉ O ₁₂	Apigenin acetylhexoside	Helmja et al. (2008)	
77	19.83	231, 295sh, 321	625.1381	-	2.91	15.4	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₇	Quercetin 3,7-dihexoside/quercetin 3-sophoroside	Ferreres et al. (2010) and Iijima et al. (2008a)	
82	20.92	233, 254, 352	741.1842	-	0.73	34.2	C ₃₂ H ₃₇ O ₂₀	Rutin pentoside (quercetin hexose-deoxyhexose-pentose)	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Ferreres et al. (2010), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)	

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak ^a	LC	DAD RT (min)	UV bands (nm) ^b	ESI(-) TOF				Assignment	
				Experimental Acc. Mass [M–H] ⁻	CID in MS spectra ^c	Error (mDa)	mSigma value	Formula for the detected [M–H] ⁻	Tentative identification
83	21.12	235, 270, 345sh	609.1444	–	1.66	24.9	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Kaempferol 3,7-dihexoside	Moco et al. (2006)
85	21.49	236, 265, 346	639.1539	–	2.74	11.3	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₇	Isorhamnetin 3-sophoroside/ isorhamnetin 3-gentiobioside	Ferreres et al. (2010)
86	21.89	233sh, 255, 352	609.1440	–	2.15	1.8	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	Rutin ^e	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Ferreres et al. (2010), Helmja et al. (2008), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008), Schindler et al. (2005), Slimestad et al. (2008) and Yamanaka et al. (2008)
87	22.02	236, 265	725.1919	–	1.55	14.5	C ₃₂ H ₃₇ O ₁₉	Kaempferol rutinoside pentoside	Ferreres et al. (2010), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2007, 2008)
90	22.57	234, 284	597.1802	–	2.28	2.7	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₅	Phloretin dihexoside	Adato et al. (2009) and Slimestad et al. (2008)
93	23.29	238, 287	593.1481	–	3.11	46.2	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	Kaempferol 3-rutinoside ^e	Le Gall et al. (2003), Helmja et al. (2008), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Slimestad et al. (2008)
99	25.74	239, 363	433.1144	271.0603 [M–H–hex] ⁻	–0.42	20.8	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	Naringenin chalcone hexose I	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Iijima et al. (2008b), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)
101	25.92	239, 301	433.1151	271.0614 [M–H–hex] ⁻	–1.09	10.7	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	Naringenin chalcone hexose II	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Iijima et al. (2008b), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008)
102	26.81	239, 289, 313sh	287.0555	179.0452 [M–Bring] ⁻ , 151.0013 ^{1,3} A ⁻ , 135.0501 ^{1,3} B ⁻	0.65	3.2	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	Eriodictyol chalcone	Adato et al. (2009) and Mintz-Oron et al. (2008)
103	27.53	241, 291	287.0558	151.0013 ^{1,3} A ⁻	0.32	31.8	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	Eriodictyol	Adato et al. (2009) and Iijima et al. (2008a,b)
104	27.70	241, 315, 370	301.0347	151.0045 ^{1,2} A ⁻ –CO	0.72	16.5	C ₁₅ H ₉ O ₇	Quercetin ^e	Helmja et al. (2008) and Moco et al. (2006)
113	29.62	239, 289	271.0606	151.0040 ^{1,3} A ⁻	0.55	9.9	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	Naringenin ^e	Adato et al. (2009), Helmja et al. (2008), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Schindler et al. (2005)
114	30.00	240, 367	271.0607	151.0047 ^{1,3} A ⁻	0.53	5.5	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	Naringenin chalcone	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Helmja et al. (2008), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Slimestad et al. (2008)
<i>Fatty acids and derivatives</i>									
97	24.60	239, 301	173.1180	–	0.27	11.3	C ₉ H ₁₇ O ₃	Hydroxy-nonanoic acid	–
111	29.03	–	228.1602	211.1344 [M–H–NH ₃] ⁻	0.35	20.7	C ₁₂ H ₂₂ NO ₃	12-Amino-12-oxo-dodecanoic acid	–
112	29.52	–	227.1295	–	–0.65	10.1	C ₁₂ H ₁₉ O ₄	Traumatic acid	–
115	31.09	–	327.2183	–	–0.62	19.7	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	Trihydroxy-octadecadienoic acid I	–
116	31.29	–	327.2169	309.2063 [M–H–H ₂ O] ⁻	0.79	15.9	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	Trihydroxy-octadecadienoic acid II	–
117	31.59	–	327.2171	–	0.64	61.2	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	Trihydroxy-octadecadienoic acid III	–
118	31.84	–	242.1766	225.1471 [M–H–NH ₃] ⁻	–0.39	15.3	C ₁₃ H ₂₄ NO ₃	13-Amino-13-oxo-tridecanoic acid	–
119	32.71	–	327.2177	–	0.00	327.1	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	Trihydroxy-octadecadienoic acid IV	–
120	32.90	–	329.2322	171.1023 [M–H–158] ⁻	1.13	5.3	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	Hydroxyoctadecanedioic acid I	Wang et al. (2000)
121	33.80	–	287.2222	–	0.59	11.0	C ₁₆ H ₃₁ O ₄	Dihydroxypalmitic acid	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008), Osman et al. (1995) and Wang et al. (2000)
122	34.40	–	329.2329	271.1877 [M–H–58] ⁻ , 171.1002 [M–H–158] ⁻	0.48	4.5	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	Hydroxy-octadecanedioic acid II	Wang et al. (2000)
123	34.81	–	329.2322	171.1012 [M–H–158] ⁻	1.28	6.3	C ₁₈ H ₃₃ O ₅	Hydroxy-octadecanedioic acid III	Wang et al. (2000)
124	36.55	–	311.2213	–	1.52	16.6	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	Hydroperoxy-octadecadienoic acid I	–
125	36.75	–	311.2216	–	1.21	65.3	C ₁₈ H ₃₁ O ₄	Hydroperoxy-octadecadienoic acid II	–
126	37.15	–	293.2122	275.1988 [M–H–H ₂ O] ⁻	1.83	7.3	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Hydroxy-octadecatrienoic acid I	–
127	37.27	–	293.2105	275.1980 [M–H–H ₂ O] ⁻	1.75	12.9	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Hydroxy-octadecatrienoic acid II	–
128	37.75	244	295.2264	–	1.42	5.2	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	Hydroxy-octadecatrienoic acid I	–
129	38.02	–	293.2107	–	1.54	47.7	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Hydroxy-octadecatrienoic acid III	–

130	38.15	–	293.2108	–	1.41	26.0	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Hydroxy-octadecatrienoic acid IV	–
131	38.40	–	293.2117	–	0.48	12.1	C ₁₈ H ₂₉ O ₃	Hydroxy-octadecatrienoic acid V	–
132	38.82	–	255.2320	–	0.99	49.0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	Hexadecanoic acid (palmitic acid)	Demirbas (2010), Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes (2009), Lazos et al. (1998), Le Gall et al. (2003), Morvai and Molnar-Perl (1992) and Mounet et al. (2007)
133	38.97	–	295.2263	–	1.55	35.2	C ₁₈ H ₃₁ O ₃	Hydroxy-octadecadienoic acid II	–
134	39.11	–	283.2643	–	–0.07	25.0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	Octadecanoic acid (stearic acid)	Demirbas (2010), Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes (2009), Lazos et al. (1998) and Mounet et al. (2007) and Wang et al. (2000)
135	39.29	–	277.2149	–	2.39	13.6	C ₁₈ H ₂₉ O ₂	Octadecatrienoic acid (linolenic acid)	Demirbas (2010), Le Gall et al. (2003) and Mounet et al. (2007)
<i>Other metabolites</i>									
28	5.41	218, 297	218.1023	146.0798 [M–H–CO–CO ₂] [–]	1.10	9.3	C ₉ H ₁₆ NO ₅	Pantothenic acid	Buescher et al. (2010)
33	6.98	219, 289	380.1549	–	1.29	5.2	C ₁₅ H ₂₆ NO ₁₀	Pantothenic acid hexose	Adato et al. (2009), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006)
47	11.60	219, 270, 326	443.1907	–	1.59	3.0	C ₂₁ H ₃₁ O ₁₀	Dehydrophaseic acid hexose	Bino et al. (2005)
56	13.56	220, 297	210.0763	124.04071 [M–H–CO ₂ –C ₂ H ₂ O] [–]	0.92	3.8	C ₁₀ H ₁₂ NO ₄	3,4-Dihydroxyphenyl-1-methyl ester-carbamic acid	–
59	14.29	219, 292	411.1862	249.1356 [M–H–162] [–] , 161.0455 [M–H–162–88] [–]	0.99	8.9	C ₁₇ H ₃₁ O ₁₁	(Iso)pentyl dihexose	Moco et al. (2007, 2008)
70	17.84	227, 287	381.1774	249.1307 [M–H–pent] [–]	–0.77	2.8	C ₁₆ H ₂₉ O ₁₀	3-Methylbutyl 6-O-D-apio-β-D-furanosyl-β-D-glucopyranoside	–
89	22.22	237, 277	425.1789	263.1271 [M–H–162] [–] , 153.0881 [263–110] [–]	2.78	27.7	C ₂₁ H ₂₉ O ₉	Abscisic acid hexose ester	Bino et al. (2005)

^a Peak numbers assigned according to the overall elution order.

^b “–” Undetectable absorbance or below 5 mAU.

^c CID, collision-induced dissociation; hex, loss of hexose moiety (–162 u); pent, loss of pentose moiety (–132 u); caff, caffeic acid moiety; fer, ferulic acid moiety; quin, quinic acid moiety.

^d Publications where a large number of the metabolites we found were also identified in the tomato fruit or those where a metabolite has been previously determined only once.

^e Identification confirmed by comparison with authentic standards; I, II and III different isomers.

Table 2
HPLC-DAD-ESI(–)-TOF-MS and ESI(+)-TOF-MS data of the triterpenoid glycosides identified.

Peak ^a	LC RT (min)	DAD UV bands (nm) ^b	ESI(–)TOF		ESI(+) TOF		Assignment		
			[M–H] [–] exp	Ions observed in MS ^c	[M+H] ⁺ exp	Ions observed in MS ^c	Tentative identification	Chemical Formula (M)	References
80	20.85	234, 285	–	642.8 [M–H–2hex–pent–128] [–]	1228.4	772.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 610.4 [M+H–3hex–pent] ⁺	Esculeoside B I	C ₅₆ H ₉₃ NO ₂₈	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)
84	21.35	235, 327sh	–	642.8 [M–H–2hex–pent–128] [–]	1228.4	934.4; [M+H–hex–pent] [–] , 772.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 610.4 [M+H–3hex–pent] ⁺	Esculeoside B II	C ₅₆ H ₉₃ NO ₂₈	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)
88	22.07	236, 276	1226.6	642.8 [M–H–2hex–pent–128] [–]	1228.4	772.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 610.4 [M+H–3hex–pent] ⁺	Esculeoside B III	C ₅₆ H ₉₃ NO ₂₈	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)
91	22.79	237, 301	1268.6	693.8 [M–H–2hex–pent–2CH ₂ O–59] [–] , 663.8 [M–H–2hex–pent–3CH ₂ O–59] [–] , 633.8 [M–H–2hex–pent–4CH ₂ O–59] [–]	1270.4	814.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 652.4 [M+H–3hex–pent] ⁺ , 634.4 [M+H–3hex–pent–H ₂ O] ⁺	Esculeoside A/lycoperoside F,G I	C ₅₈ H ₉₅ NO ₂₉	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)
95	23.91	239, 291	1268.6	1208.8 [M–H–2CH ₂ O] [–] , 693.8 [M–H–2CH ₂ O–515] [–] , 663.8 [M–H–605] [–] , 633.8 [M–H–605–CH ₂ O] [–]	1270.4	814.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 652.4 [M+H–3hex–pent] ⁺	Esculeoside A/lycoperoside F,G II	C ₅₈ H ₉₅ NO ₂₉	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008) and Moco et al. (2006, 2007, 2008)
98	25.07	242, 293	–	–	–	918.4 [M+H–pent] ⁺ , 594.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 432.3 [M+H–3hex–pent] ⁺	Lycoperoside H/singly hydroxylated α-tomatine	C ₅₀ H ₈₃ NO ₂₂	Adato et al. (2009), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007) and Yamanaka et al. (2008)
100	25.74	–	–	–	1108.4	814.4 [M+H–hex–pent] ⁺ , 652.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 592.4 [M+H–2hex–pent–2CH ₂ O] ⁺ , 490.4 [M+H–3hex–pent] ⁺	Esculeoside A lacking O27 glucosyl residue / hydroxyl-lycoperoside A,B,C	C ₅₂ H ₈₅ NO ₂₄	Iijima et al. (2008a) and Yamanaka et al. (2008) / Adato et al. (2009)
105	27.85	–	–	–	1032.5	576.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 414.3 [dehydrotomatidine+H] ⁺	Dehydrotomatine	C ₅₀ H ₈₁ NO ₂₁	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007) and Yamanaka et al. (2008)
106	27.95	–	1079.5	569.3 [M–H–2hex–pent–3H ₂ O] [–] , 539.3 [M–H–2hex–pent–3H ₂ O–CH ₂ O] [–]	–	1063.4 [M+H–H ₂ O] ⁺ , 901.4 [M+H–H ₂ O–hex] ⁺ , 739.4 [M+H–H ₂ O–2hex] ⁺ , 577.4 [M+H–H ₂ O–3hex] ⁺ , 415.3 [M+H–H ₂ O–3hex] ⁺	Dehydrotomatoides ^d	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₄	Yamanaka et al. (2008)
107	28.20	231, 291	1081.5	570.3 [M–H–2hex–pent–2H ₂ O–17] [–] , 540.3 [M–H–2hex–pent–2H ₂ O–17–CH ₂ O] [–]	–	1065.4 [M+H–H ₂ O] ⁺ , 903.4 [M+H–H ₂ O–hex] ⁺ , 579.4 [M+H–H ₂ O–3hex] ⁺ , 417.4 [M+H–H ₂ O–4hex] ⁺	Tomatoides A ^d	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₄	Moco et al. (2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)
108	28.20	244, 295sh, 329	–	–	1092.4	960.4 [M+H–pent] ⁺ , 798.4 [M+H–hex–pent] ⁺ , 636.4 [M+H–2hex–pent] ⁺	Lycoperoside A, B, C	C ₅₂ H ₈₅ NO ₂₃	Adato et al. (2009), Moco et al. (2006, 2007) and Iijima et al. (2008a)
109	28.33	244, 295sh, 330	–	–	1034.4	902.4 [M+H–pent] ⁺ , 741.4 [M+H–hex–pent+1] ⁺ , 578.4 [M+H–2hex–pent] ⁺ , 416.3 [tomatidine+H] ⁺	α-Tomatine	C ₅₀ H ₈₄ NO ₂₁	Adato et al. (2009), Bino et al. (2005), Iijima et al. (2008a), Mintz-Oron et al. (2008), Moco et al. (2006, 2007, 2008) and Yamanaka et al. (2008)

I, II and III different isomers.

^a Peak numbers assigned according to the overall elution order.

^b “–” Undetectable absorbance or below 5 mAU.

^c Hex, loss of hexose moiety (–162 u); pent, loss of pentose moiety (–132 u).

^d Saponins.

by “–”), $[M-H]^-$ m/z experimental, fragments produced by collision-induced dissociation (CID) in the MS spectra – in some cases more intense than the deprotonated molecular ion, error, $mSigma$ value (both these latter parameters are explained in Section 4.5), the formula generated by the software for the detected deprotonated molecular ion, the tentative assignment for this formula and references. Several of the tentatively identified metabolites have not been reported in the tomato fruit before, although most identifications corresponded to previously detected compounds.

2.1.1. Diode-array detector (DAD)

The DAD allowed us to record the UV/Vis spectrum of every peak in the chromatogram in the range of 190–950 nm and thus attribute each to a certain class of metabolite, since every type of chromophore exhibits a characteristic spectrum and absorbance maximum. Nevertheless, we were aware that peak resolution was not complete in many cases and thus the UV/Vis spectrum of some compounds might hide the spectrum of other analytes. The UV/Vis spectra of trace compounds could not be clearly identified.

Amino acids and organic acids have been previously detected at 210–220 nm (Amin et al., 1995; Marconi et al., 2007), nucleosides at 260 nm (Ikeda et al., 2008) and glycoalkaloids at 205 nm (Bushway et al., 1994), although we observed a higher absorption at 240 nm. In general, fatty acids exhibit only moderate UV absorption at very low wavelengths, with the exception of those containing chromophores in their molecules (e.g. polyunsaturated and conjugated fatty acids). The absorption of the fatty acids detected in the methanol extract was very slight (when lower than 5 mAU we did not include the data in the table). The UV spectra of phenolic compounds exhibit two major absorption peaks, commonly referred to as band I (300–380 nm) and band II (240–280 nm). Band I is associated with cinnamoyl systems and band II with benzoyl systems (Abad-García et al., 2009) and so hydroxycinnamic acids were monitored at 320 nm and hydroxybenzoic acids at 280 nm. As far as flavonoids are concerned, each subclass exhibited different characteristic bands: flavones and flavonols presented an intense band I, at 320 and 370 nm, whereas flavanones and dihydrochalcones were monitored at 280 nm in band II; chalcones absorbed in both bands.

2.1.2. Mass spectrometry detection (MS)

Accurate mass measurement (obtained by TOF detector) was used as the first step towards determining the identity of a detected metabolite since it provided a set of elemental formulae. Structural information was obtained via MS/MS (using the IT detector) in the knowledge that breakages will occur at the weakest points of the molecular ion. For example, the glycosidic linkages of glycosylated metabolites fragmented, losing the monosaccharide residues. The type of sugar was established by the mass difference between the glycoside and the aglycone: a difference of 132 u for pentose, 146 u for deoxyhexose, 162 u for hexose and 308 u for deoxyhexosylhexose.

The majority of the polar metabolites, which include most of the amino acids, organic acids and nucleosides, eluted as a large peak (i.e. numerous signals overlapping) before 3.5 min retention time. Very polar compounds could not be properly separated with the C18-reversed-phase-LC method developed. Nonetheless, the use of TOF-MS and the availability of some in-house standards enabled us to confirm the identity of these metabolites. All the organic acids and amino acids eluted before 3 and 7 min, respectively, with the exception of three derivatives, which eluted later than the rest of the compounds within the same class: amino oxononanoic acid (peak 71), which lost its CO_2 group, thus suggesting a carboxylic acid function; acetyl tryptophan (peak 78), which lost an acetyl group; and the organic acid isopropylmalic acid (peak 34),

intermediate in the biosynthesis of valine, leucine and isoleucine), which eluted several minutes after malic acid and showed a loss of 60 u ($2CH_3$).

Three Amadori compounds were detected in the Daniela extract: fructosyl glutamate, fructosyl leucine/isoleucine and fructosyl phenylalanine (peaks 6, 21 and 26, respectively). They have been previously reported in dried tomatoes (Davidek et al., 2005) and the fragmentation pattern in the positive-ion mode completely agreed with that reported. Amadori compounds are 1-amino-1-deoxyketoses formed during the first step of the Maillard reaction via the condensation of amino acids and aldose sugars. Such changes in food constituents occur during food processing, dehydration and storage. The reaction does not require high temperatures and so sugars and amino acids can show signs of this reaction even when stored under refrigeration. The reaction rate, however, increases noticeably at high temperature under alkaline conditions and low moisture level, and can also take place in aqueous solutions (Porretta, 1992). Amadori compounds are considered to be precursors of the colour, aroma and flavour of processed foods and so a determination of their levels could provide a sensitive indicator for early detection of these changes (Sanz et al., 2000).

As has also been reported in other studies (Mintz-Oron et al., 2008; Moco et al., 2006, 2007, 2008), a number of phenolics occurred more than once within the chromatogram: feruloyl-hexose, caffeoyl-hexose, dicaffeoylquinic acid, homovanillic acid hexose and naringenin dihexose. Apparently, these metabolites can exist as different constitutional isomers in tomatoes. Glycosylation affects retention time according to the type of saccharide and the position of the bond, although the position of the sugar affects the retention time more than the nature of the saccharide (Abad-García et al., 2009). It is often unclear in the literature which particular isomer has been detected and our method does not allow us to assign unambiguously the structure of these isomers either.

Phenolic acids and their derivatives ionised better in the negative mode and most of them presented in-source fragments, losses of 18 u (H_2O) and 44 u (CO_2) being regularly observed. Apart from flavonoids, hydroxycinnamic acids and related compounds (consisting of quinic acid or other polyhydroxyaliphatic acids) constitute the main phenolic compounds in tomatoes. Conjugated forms of caffeic acid, coumaric acid (most likely *p*-coumaric acid) and ferulic acid were detected. Peaks 35, 37, 42 and 46 of m/z 341 ($[M-H]^-$) were tentatively identified as being isomeric caffeoyl-hexose, even though most publications have assigned this mass to caffeic acid hexose isomers. Clifford et al. (2007) reported that caffeoyl esters show evidence of sugar fragmentation in their MS/MS spectra (the case of the above-mentioned peaks), which allowed us to distinguish glycosides from the sugar esters of all the phenolic-acid derivatives detected. In some cases, where the MS/MS spectrum is unclear, we have left both compounds as possible identifications.

Four chromatographic peaks corresponding to caffeoylquinic acids, three to dicaffeoylquinic acids, and one to tricaffeoylquinic acid were found. The 3-caffeoylquinic acid (peak 44) was unambiguously identified by comparison with the commercial standard. According to previous studies using a comparable analytical system (Moco et al., 2007), the compound eluting afterwards was 5-caffeoylquinic acid (peak 52), and then 4-caffeoylquinic acid (peak 65). To our knowledge, 1-caffeoylquinic acid (peak 38) has never been detected in the tomato fruit before and would be the first of the isomers to elute. As an example of the information that can be gathered with the different detectors, the spectra for 5-caffeoylquinic acid in the three tomato varieties are shown in Fig. 3. This acid showed the typical UV/Vis absorption spectrum of hydroxycinnamic acid and its derivatives with a peak between

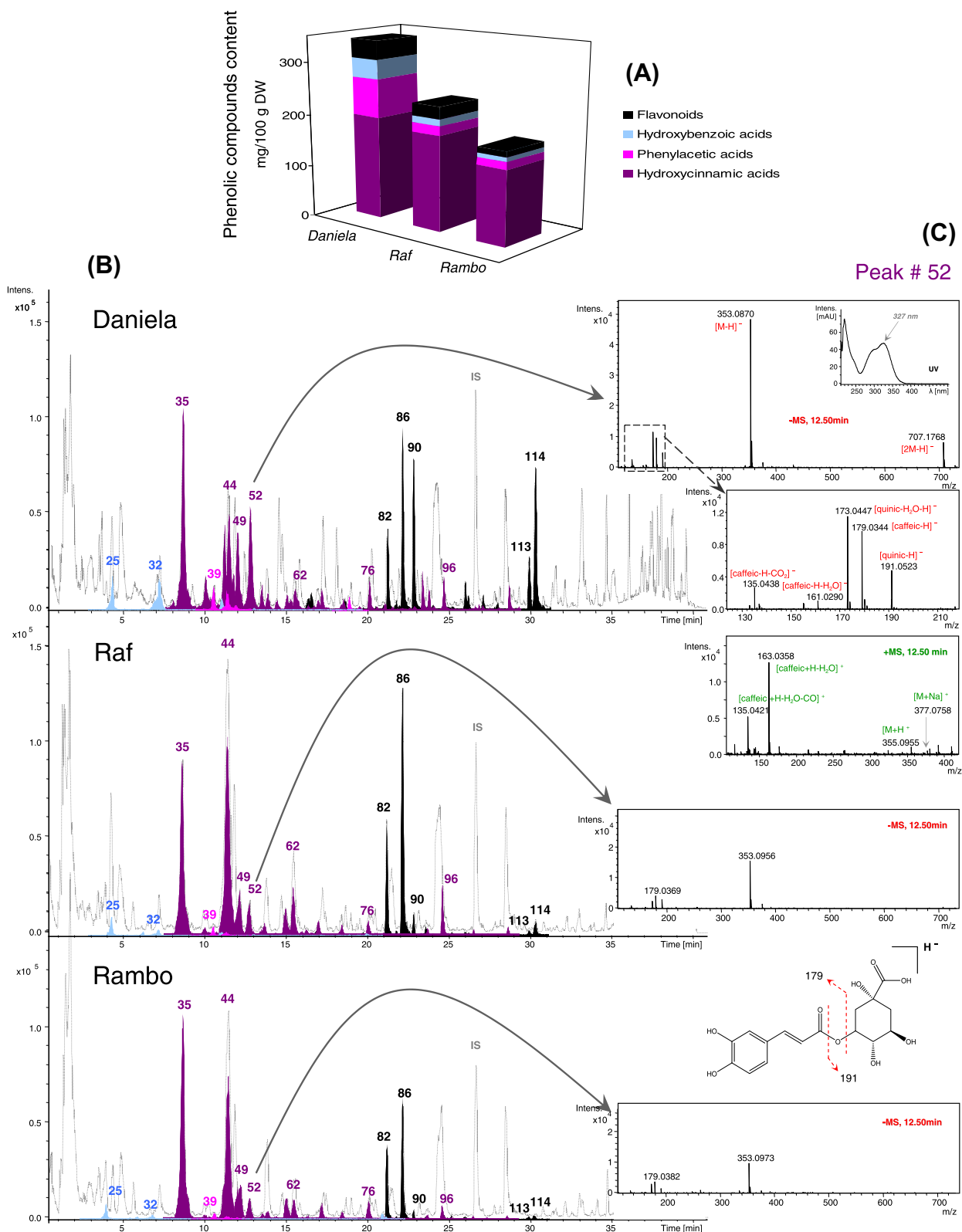


Fig. 3. (A) Graph showing the total quantity of phenolics and representation of each family within the total in the different tomato varieties. (B) Profiles of Daniela, Raf and Rambo tomatoes using ESI(-)-TOF detection. To represent the phenolic content in each variety the peak areas coloured according to the family the phenolic compound belongs to. (C) Mass spectra obtained with the TOF detector in the negative-ionisation mode of peak 52 from the three tomato varieties, the structure of 5-caffeoylquinic acid (compound assigned as peak 52) and its possible breakages and UV/Vis absorption spectrum and mass spectrum in the positive ionisation mode from Daniela tomato.

305 and 330 nm (band I) and a shoulder between 290 and 300 nm (band II). The mass spectra showed that negative-ionisation provided stronger ion peaks and more fragments than positive ionisation. The spectrum in the negative-ion mode showed a

deprotonated molecular ion at m/z 353 and in-source fragments with m/z 191 and 173 from quinic acid and m/z 179, 161 and 135 from caffeic acid. The dimer at m/z 707 ($[2M-H]^-$) was also present in the MS spectrum.

Other phenolic acids are described for the first time in the tomato fruit: gentisic acid (peak 30), dihydroxybenzoic acid pentose (peak 32), dihydroxycinnamic acid hexose (peak 58), sinapic acid hexose (peak 57), two different hydrocinnamic acid hexoses (peak 40 and 53) and homoveratric acid (peak 74).

Flavonoids have a basic structure consisting of two aromatic benzene rings separated by an oxygenated heterocyclic ring. Compounds belonging to various flavonoid classes (dihydrochalcone, chalcone, flavone, flavanone and flavonols) were detected in the tomato samples analysed in this study. Due to the different absorption spectra of chalcones and flavanones it was easy to distinguish between the derivatives of the isobaric compounds chalconaringenin and naringenin, since the latter presented no band I.

Two classes of triterpenoid glycosides could be identified in our tomato samples: glycoalkaloids and saponins. Glycoalkaloids are nitrogen-bearing compounds containing a sugar chain (three or four units) linked to a steroidal moiety (aglycone). The structure of saponins is very similar but they do not contain a nitrogen. Both positive- and negative-ion tandem mass spectrometry are considered to be suitable for the characterisation of triterpenoid glycosides, but these compounds ionised more efficiently in the positive-ion mode, showing lower detection limits and numerous intense fragments, which were structurally informative. In fact, all of them showed more intense fragments than the (de)protonated molecular ion. The data for both ionisation modes of the triterpenoid glycosides identified here are set out in Table 2. Peaks 98, 100, 105, 108 and 109 could not be detected in the negative-ion mode. Three isomers of esculeoside B were detected, at retention times of 20.85, 21.35 and 22.07 min (peaks 80, 83 and 88, respectively). Some of the compounds (peaks 91, 95, 98 and 108) could not be identified unambiguously. Although the $[M-H]^-$ ion of the saponins tomatoside A and dehydrotomatoside was observed, the $[M+H]^+$ ion could not be detected, $[M+H-H_2O]^+$ being the main fragment ion in the positive-mode spectrum (Yamanaka et al., 2008).

The fatty acids in the tomato fruit come mostly from its seeds and cuticle. Tomato seeds are considered to be a good source of edible oil and consequently its fatty-acid composition has been examined (Demirbas, 2010; Lazos et al., 1998). The cuticle is a thin lipophilic layer that covers the aerial organs of all plants and pro-

vides protection against diverse stress conditions. It is composed mainly of cutin, a polymer of mainly C_{16} and C_{18} hydroxy fatty acids and waxes. The metabolites composing the cuticle, and particularly the cutin monomers, have been analysed in detail (Adato et al., 2009; Mintz-Oron et al., 2008; Osman et al., 1995; Wang et al., 2000). The fatty-acid content of eight varieties of tomato fruit from Almería has been previously reported (Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes, 2009). We identified 13 fatty acids in the methanol extract of the Daniela cultivar. Among these, dihydroxypalmitic (peak 121), hydroxy-octadecanedioic (peaks 10, 122 and 123), palmitic (peak 132), stearic (peak 134) and linoleic (peak 135) acids have been previously reported in the tomato seeds or cuticle. Three fatty acids, hydroperoxy-octadecadienoic, hydroxy-octadecatrienoic and hydroxy-octadecadienoic acids, have been described in tomato seedlings (Delaplace et al., 2009) but not in the tomato fruit itself. Except for the growth hormone traumatic acid (peak 112), the rest of the compounds were hydroxy fatty acids, presumably produced by the oxidative metabolism of polyunsaturated fatty acids. We were unable to provide an unambiguous structural assignment of the hydroxyl-fatty-acid isomers detected in the tomato samples because we could not establish the location of the functional groups and *E/Z* geometry of the double bonds. The retention time of the fatty acids was affected by their chain length, degree of unsaturation and hydroxy-substituents. These were less polar metabolites of all the chromatogram and thus eluted with the highest water percentages.

To complete the profiling of the whole extract, three phenyl alcohol glycosides, as well as another seven compounds belonging to other classes of metabolite were tentatively assigned.

2.2. Analytical method validation

The HPLC-ESI-TOF-MS approach in the negative-ion mode was validated by taking into account selectivity, linearity, sensitivity, precision and robustness, and was subsequently used to analyse the quantities of the phenolic compounds detected.

In developing the HPLC method we investigated different chromatographic conditions to obtain the separation of the major metabolites: good peak resolution and an acceptable time-frame, although we are aware that under the conditions established, baseline separation was not obtained for all the compounds.

Table 3
Analytical parameters of the HPLC-ESI-TOF-MS method developed.

Analyte	Standards					Daniela tomato			
	Linear range (ppm)	Equation ^a	r^2	n	LOD ^b (ppm)	Intraday precision ^c		Interday precision ^d	
						Peak area RSD (%)	Retention time RSD (%)	Peak area RSD (%)	Retention time RSD (%)
Protocatechuic acid	0.5–75	$y = 9956.5x - 4852.6$	0.999	10	0.42	3.14	0.11	6.16	0.32
Gentisic acid	0.5–75	$y = 9533.7x - 6085.1$	0.999	9	0.36	0.57	0.37	2.40	0.76
<i>p</i> -Coumaric acid	0.5–75	$y = 11,493x - 12954$	0.999	9	0.42	3.60	0.14	6.08	0.15
Caffeic acid	0.5–100	$y = 20,898x - 1459.3$	0.999	9	0.29	1.96	0.27	7.90	0.23
Ferulic acid	0.5–100	$y = 7710.9x + 8231.7$	0.998	10	0.27	2.05	0.08	3.25	0.06
Chlorogenic acid	0.5–300	$y = 6495.3x - 24,982$	0.996	12	0.68	3.23	0.05	5.60	0.10
Homovanillic acid	5–100	$y = 2942.8x - 6501.2$	0.998	9	1.50	1.78 [*]	0.06 [*]	5.13 [*]	0.11 [*]
Naringenin	0.5–100	$y = 56,013x + 147,985$	0.996	10	0.03	1.90	0.05	6.50	0.04
Quercetin	0.5–100	$y = 40,795x + 10,8302$	0.996	9	0.07	2.21	0.07	7.40	0.09
Kaempferol-3-rutinoside	0.5–100	$y = 26,414x + 97,468$	0.994	9	0.07	1.62	0.09	5.45	0.10
Rutin	0.5–100	$y = 21,201x + 73,068$	0.994	9	0.09	1.04	0.07	3.97	0.06

^a Linear least-squares regression analysis. Regression equation: $y = ax + b$, in which x is the concentration of phenolic compounds in mg/l and y is the detection response (peak area in TOF detector), r^2 is the determination coefficient and n is the number of points of each calibration curve.

^b LOD was determined at a signal-to-noise (S/N) ratio of 3; LOQ can be calculated as $10/3 \times \text{LOD}$.

^c Analysis of three tomato extracts ($n = 3$, different samples extracted).

^d Analysis of the same sample for six consecutive days ($n = 6$).

* Values corresponding to homoveratric acid in the samples.

Nevertheless, we consider that we did achieve satisfactory selectivity, combining the efficiency of LC separation with mass spectrometry and allowing us to identify the different metabolites and quantify the phenolic compounds present.

The chosen internal standard (daidzein) met all our requirements both in terms of its retention time, which did not interfere with other metabolites, and detector response.

The parameters of the regression equations and the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were obtained with 11 phenolic compound standards. All the phenolics chosen showed good linearity over the concentration range studied ($r^2 > 0.993$). LOD and LOQ were determined to evaluate the sensitivity of the method. The regression parameters as well as LODs are included in Table 3, from whence the LOQs can be easily calculated ($10/3 \times \text{LOD}$). As can be seen, except for homovanillic acid, the LODs of the analytes studied are less than 1 mg/l, the flavonoid LODs being around 10 times smaller than those of the phenolic acids.

Intraday precision, taking into account both peak area and retention time, was expressed as relative standard deviation (RSD%). For an intermediate concentration value of the linear range of the standards studied ($n = 3$), peak area RSD and retention time RSD were lower than 3% and 1%, respectively (data not included).

Further studies using tomato extracts instead of standards were conducted to assess the precision and robustness of the method. We confirmed intraday repeatability by analysing three different methanol extracts of various Daniela tomatoes on the same day and studying the same analytes as we did for standard repeatability, except for homovanillic acid, instead of which as reference compound we used homoveratric acid, which belongs to the same family and has a very similar structure. Interday reproducibility was assayed on six consecutive days using the same tomato extract (Table 3). The results were more precise for retention time than for peak area, which demonstrates how both the extraction and the ionisation processes could exacerbate reproducibility. Although the interday results were less precise than the intraday results, especially for the peak areas, we still achieved good overall repeatability.

Small but deliberate variations in several parameters (extraction time, pH of the mobile phase, flow rate, percentage of acetonitrile in the mobile phase, temperature, injection volume and column) were introduced into the process to assess the robustness of the method. The degree of reproducibility of the results obtained proved that the method was robust, with peak area and retention time RSDs lower than 10% and 1%, respectively, with all the 11 phenolic compounds studied in the Daniela tomato extract (data not included).

2.3. Occurrence of phenolic compounds. Comparison of the three tomato cultivars from Almería

Once our method was validated, we applied it to the quantitative analysis of the phenolic compounds identified in the three tomato varieties studied. Since one of the possible uses of these data is to include phenolic contents in the Spanish composition databases, we conducted the study with whole fruit, because the removal of the skin and seed would cause a major change in the tomato's overall metabolic profile.

One possible approach when standards are not commercially available is to quantify by using an external standard with a similar structure to the compound in question. Our quantitative estimates in this study were based on calibrations generated by using a closely related derivative of the same phenolic family: all hydroxybenzoic acids were quantified by reference to protocatechuic acid; hydroxycinnamate derivatives by reference to caffeic acid, phenylacetic acid derivatives by reference to homovanillic acid; and flavonoids by reference to quercetin. It is important to bear in mind that

even though this is an accepted and widely used approach, the chosen standards do not have the exact MS response as the analytes in question, due mainly to their different behaviour during nebulization. Therefore, we are aware of possible under/over estimations in the quantities of phenolics. Nevertheless, the quantification carried out made it possible for us to determine the level of phenolics in each tomato variety and to distinguish the richest phenolic compound/family among the samples.

Among the detectors employed for the identification of phenolic compounds, TOF-MS was chosen to study their occurrence, since baseline separation could not be obtained for all of them, making it unfeasible to quantify them accurately by DAD. The MS software provides extracted ion chromatograms, allowing for the quantification of coeluting compounds, except when there are isobaric compounds. This was the case with peaks 66 and 67 and 95 and 101, which were quantified together. Generally DAD linearity responses are bigger than those given by MS, mainly because the degree of ionisation in the ion source decreases concomitantly with an increase in the number of ions. Nevertheless, the linear range employed in our quantification covered the range of concentrations of the phenolic compounds found in the samples. The results of the quantitative analysis are summarised in Table 4, which includes the quantification of both individual phenolic compounds and families and the percentage that each compound depicts within its family and within all phenolics. As can be seen, the Daniela cultivar is the richest in phenolic contents. The phenolic patterns were rather similar qualitatively, even though differing quantitatively, with the exception of 8 phenolics that could be found in Daniela, but not in Raf or in Rambo, or sometimes in either (gentisic acid, homovanillic acid hexose III, naringenin dihexose I and II, apigenin acetylhexoside, eriodictyol, eriodictyol chalcone and quercetin). Fig. 3 shows the complete metabolite profile of all three varieties. The peaks corresponding to phenolic metabolites are coloured to show to the family they belong to. As commented in a previous section, the mass spectra of peak 52 in each sample are shown. A graph with the content of the four families found in the tomato varieties is also included.

In all the tomato cultivars, hydroxycinnamic acids and their derivatives are the most abundant family, accounting for 58% (Daniela), 78% (Raf) and 81% (Rambo) of the total phenolics in the fruit. Within this family the major compounds were caffeoylhexose I, coumaric acid hexose I, chlorogenic acid and 5-caffeoylquinic acid, the latter being a main compound only in Daniela.

The second most abundant were the phenylacetic acids and derivatives, homovanillic acid hexose I and II (each reaching levels of ~25 mg/100 g dry weight) being two of the most abundant phenolic compounds in Daniela. This finding is surprising and does not accord with the published literature in that this class of phenolics has scarcely been reported hitherto in the tomato (Helmja et al., 2008).

Conjugated quercetin, primarily rutin and rutin pentoside, were the main flavonols, with a content of approximately 80% of total flavonoids in the Raf and Rambo cultivars. In Daniela, besides these flavonols, the main flavonoids were phloretin dihexoside (dihydrochalcone), naringenin (flavanone) and chalconaringenin (chalcone).

3. Concluding remarks

The HPLC-DAD-MS based approach is of particular importance in the metabolic profiling of plants due to the highly diversity of phytochemicals that they generally contain. The objective of our 'non-targeted' metabolic profiling analysis was to determine all detectable metabolites in the methanol extract of three cultivars of tomato. A total of 135 compounds belonging to various classes

Table 4
Quantitative analysis of phenolic compounds individually and in terms of families, and the percent age that each one represents within its family and within all the phenolic compounds found in each tomato variety.

Peak#	Compound	Daniela			Raf			Rambo		
		mg/100 g DW ^a	% within phenolic family	% within all phenolics	mg/100 g DW ^a	% within phenolic family	% within all phenolics	mg/100 g DW ^a	% within phenolic family	% within all phenolics
<i>Hydroxybenzoic acids and derivatives – quantified with the calibration curve of protocatechuic acid</i>										
25	Hydroxybenzoic acid hexose	9.67 ± 0.22	26.25	2.82	5.88 ± 0.17	50.10	2.51	4.48 ± 0.41	57.11	2.43
27	Protocatechuic acid	2.50 ± 0.07	6.80	0.73	nq	–	–	nq	–	–
30	Gentisic acid	2.12 ± 0.01	5.76	0.62	nd	–	–	nq	–	–
32	2,3-Dihydroxybenzoic ac. pentose	16.46 ± 0.66	44.69	4.80	3.01 ± 0.14	25.62	1.28	2.35 ± 0.43	29.93	1.28
41	<i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	5.05 ± 0.20	13.71	1.47	1.73 ± 0.18	14.75	0.74	nq	–	–
75	Benzoic acid	1.03 ± 0.08	2.79	0.30	1.12 ± 0.00	9.52	0.47	1.02 ± 0.11	12.96	0.55
	Total hydroxybenzoic acids	36.84	100	10.74	11.74	100	5.01	7.84	100	4.26
<i>Hydroxycinnamic acids and derivatives – quantified with the calibration curve of caffeic acid</i>										
35	Caffeoyl-hexose I	38.32 ± 0.73	19.39	11.17	42.61 ± 0.85	23.51	18.20	46.23 ± 1.99	30.95	25.14
36	Coumaric acid hexose I	17.49 ± 0.06	8.85	5.10	18.64 ± 0.83	10.28	7.96	14.40 ± 0.69	9.64	7.83
37	Caffeoyl-hexose II	6.27 ± 0.06	3.17	1.83	2.03 ± 0.07	1.12	0.87	1.28 ± 0.22	0.85	0.69
38	1-Caffeoylquinic acid	1.65 ± 0.74	0.84	0.48	nq	–	–	nq	–	–
40	3-(2-Hydroxyphenyl) propanoic ac. hexose ^e	2.44 ± 0.14	1.23	0.71	0.78 ± 0.04	0.43	0.33	nq	–	–
42	Caffeoyl-hexose III	13.54 ± 0.35	6.85	3.95	5.71 ± 0.08	3.15	2.44	6.13 ± 0.71	4.10	3.33
44	Chlorogenic acid	24.58 ± 0.95	12.44	7.17	53.10 ± 1.29	29.29	22.68	38.74 ± 2.06	25.93	21.07
45	Ferulic acid hexose I	6.29 ± 0.06	3.18	1.83	5.44 ± 0.18	3.00	2.32	5.08 ± 0.75	3.40	2.76
46	Caffeoyl-hexose IV	7.10 ± 0.39	3.59	2.07	2.83 ± 0.13	1.56	1.21	2.57 ± 0.31	1.72	1.40
49	Caffeic acid	16.37 ± 0.32	8.28	4.77	4.35 ± 0.23	2.40	1.86	5.40 ± 0.91	3.61	2.94
50	Coumaroyl-hexose	3.19 ± 0.29	1.61	0.93	9.77 ± 0.29	5.39	4.17	6.75 ± 0.69	4.52	3.67
52	5-Caffeoylquinic acid	23.84 ± 0.86	12.06	6.95	7.34 ± 0.23	4.05	3.14	4.49 ± 0.44	3.01	2.44
53	3-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl) propanoic ac. hexose ^e	3.56 ± 0.15	1.80	1.04	0.74 ± 0.02	0.41	0.31	nq	–	–
54	Coumaric acid derivative	1.04 ± 0.16	0.52	0.30	1.16 ± 0.11	0.64	0.50	1.14 ± 0.13	0.76	0.62
57	Sinapic acid hexose	2.86 ± 0.05	1.45	0.83	2.36 ± 0.11	1.30	1.01	1.69 ± 0.19	1.13	0.92
58	Dihydroxycinnamic acid hexose	1.41 ± 0.21	0.71	0.41	0.60 ± 0.05	0.33	0.25	nq	–	–
60, 61 ^b	Feruloyl-hexose I, II	3.39 ± 0.11	1.72	0.99	5.17 ± 0.09	2.85	2.21	4.43 ± 0.93	2.97	2.41
62	4-Caffeoylquinic acid	2.78 ± 0.24	1.41	0.81	7.50 ± 0.85	4.14	3.20	4.10 ± 0.61	2.75	2.23
63	Coumaroylquinic acid I	1.71 ± 0.06	0.86	0.50	1.25 ± 0.02	0.69	0.53	0.85 ± 0.18	0.57	0.46
65	Coumaroylquinic acid II	0.64 ± 0.02	0.33	0.19	nq	–	–	nq	–	–
68	<i>p</i> -Coumaric acid	1.37 ± 0.05	0.70	0.40	nq	–	–	0.63 ± 0.02	0.42	0.34
72	Feruloylquinic acid I	1.50 ± 0.18	0.76	0.44	1.67 ± 0.10	0.92	0.71	1.09 ± 0.27	0.73	0.59
76	Ferulic acid	3.90 ± 0.13	1.97	1.14	2.00 ± 0.10	1.10	0.85	2.23 ± 0.06	2.16	1.75
79	Feruloylquinic acid II	nq	–	–	nq	–	–	nq	–	–
81	Isoferulic acid	0.62 ± 0.23	0.31	0.18	nq	–	–	nq	–	–
92	Dicaffeoylquinic acid I	4.46 ± 0.15	2.26	1.30	nq	–	–	nq	–	–
94	Dicaffeoylquinic acid II	2.67 ± 0.11	1.35	0.78	0.93 ± 0.06	0.51	0.40	nq	–	–
96	Dicaffeoylquinic acid III	1.75 ± 0.23	0.89	0.51	4.23 ± 0.92	2.33	1.81	1.13 ± 0.12	0.76	0.62
110	Tricaffeoylquinic acid	2.90 ± 0.14	1.47	0.84	1.08 ± 0.13	0.59	0.46	nq	–	–
	Total hydroxycinnamic acids	197.65	100	57.62	181.27	100	77.42	149.36	100	81.24
<i>Phenylacetic acids and derivatives – quantified with the calibration curve of homovanillic acid</i>										
39	Homovanillic acid hexose I	24.99 ± 0.37	34.08	7.29	11.39 ± 0.25	62.94	4.87	8.62 ± 0.15	57.52	4.69
43	Homovanillic acid hexose II	25.76 ± 0.02	35.13	7.51	6.71 ± 0.12	37.06	2.86	6.37 ± 0.46	42.48	3.46
48	Homovanillic acid hexose III	7.62 ± 0.22	10.40	2.22	nd	–	–	nd	–	–
74	Homoveratric acid	14.95 ± 0.24	20.39	4.36	nq	–	–	nq	–	–
	Total phenylacetic acids	77.33	100	21.38	18.10	100	7.73	14.99	100	8.15
<i>Flavonoids and glycosides – quantified with the calibration curve of quercetin</i>										
66, 67 ^b	Naringenin dihexose I, II ^d	1.57 ± 0.07	4.46	0.46	0.23 ± 0.00	1.00	0.10	nd	–	–
69	Rutin hexoside ^e	0.30 ± 0.02	0.85	0.09	0.23 ± 0.01	1.00	0.10	0.23 ± 0.01	1.97	0.12
73	Apigenin acetylhexoside ^f	0.37 ± 0.05	1.04	0.11	0.19 ± 0.01	0.81	0.08	nd	–	–
77	Quercetin derivative ^e	0.48 ± 0.16	1.36	0.14	0.13 ± 0.06	0.57	0.06	0.22 ± 0.11	1.86	0.12
82	Rutin pentoside ^e	3.69 ± 0.07	10.48	1.08	5.51 ± 0.19	23.94	2.36	3.01 ± 0.49	25.81	1.64
83	Kaempferol 3,7-dihexose ^e	0.28 ± 0.02	0.78	0.08	0.24 ± 0.09	1.03	0.10	0.29 ± 0.05	2.50	0.16

(continued on next page)

Table 4 (continued)

Peak#	Compound	Daniela			Raf			Rambo		
		mg/100 g DW ^a	% within phenolic family	% within all phenolics	mg/100 g DW ^a	% within phenolic family	% within all phenolics	mg/100 g DW ^a	% within phenolic family	% within all phenolics
85	Isorhamnetin derivative ^e	0.35 ± 0.06	0.98	0.10	0.24 ± 0.03	1.02	0.10	0.26 ± 0.03	2.21	0.14
86	Rutin ^e	9.25 ± 0.10	25.95	2.67	14.04 ± 0.21	60.09	5.94	6.18 ± 0.01	52.91	3.36
87	Kaempferol rutinoside pentoside ^e	0.29 ± 0.00	0.82	0.08	0.36 ± 0.01	1.55	0.15	0.24 ± 0.01	2.09	0.13
90	Phloretin dihexoside ^a	6.44 ± 0.04	18.31	1.88	0.67 ± 0.06	2.91	0.29	0.18 ± 0.05	1.58	0.10
93	Kaempferol 3-rutinoside ^e	0.28 ± 0.01	0.79	0.08	0.21 ± 0.03	0.90	0.09	0.23 ± 0.02	1.97	0.12
99, 101 ^b	Chalconaringenin hexose I, II ^b	1.45 ± 0.03	4.12	0.42	0.14 ± 0.04	0.59	0.06	0.25 ± 0.01	2.15	0.14
102	Eriodictyol ^d	0.52 ± 0.04	1.47	0.15	0.16 ± 0.00	0.68	0.07	nd	-	-
103	Eriodictyol chalcone ^b	0.20 ± 0.01	0.58	0.06	nd	-	-	nd	-	-
104	Quercetin ^e	0.16 ± 0.01	0.45	0.05	nd	-	-	nd	-	-
113	Naringenin ^d	2.90 ± 0.36	8.24	0.85	0.17 ± 0.04	0.74	0.07	0.27 ± 0.03	2.31	0.15
114	Chalconaringenin ^b	6.76 ± 0.35	19.22	1.97	0.66 ± 0.17	2.86	0.28	0.31 ± 0.02	2.64	0.17
	Total flavonoids	35.19	100	10.26	23.04	100	9.84	11.67	100	6.35
	Total phenolic compounds	343.00	-	100	234.14	-	100	183.87	-	100

nd, not detected (below the detection limit); nq, not quantified (between the detection and quantification limits); I, II and III different isomers.

^a DW dry weight, data representing mean value ± standard deviation ($n = 3$).

^b Peaks of two compounds with the same molecular weight almost coeluting, area of both peaks calculated together.

^c Hydroxycinnamic acid.

^d Flavanone.

^e Flavonol.

^f Flavone.

^g Dihydrochalcone.

^h Chalcone.

of metabolite, such as amino acids, organic acids, nucleosides, phenolic compounds, glycoalkaloids and fatty acids, were tentatively identified on the basis of their chromatographic retention, UV absorption and MS and MS/MS spectra in both ionisation modes, and data from the literature. To the best of our knowledge it is the first time that 21 of these compounds have been reported in the tomato fruit.

Interest surrounding phenolic compounds, their properties and bioavailability is growing. A knowledge of the phenolic content in tomatoes, including phenolic acids, flavonoids and their derivatives, will help to define their potential as a source of phenolic antioxidants. These data may even be used in the development of comprehensive food composition tables (Spanish tables currently lack antioxidant contents), providing producers with quantitative data for the marketing of quality products, and enabling consumers to identify the nutritional and quality differences between tomato cultivars and determine accurately their intake of phenolics.

The quantification data allowed us to compare the three tomato cultivars selected. Most phenolic compounds could be detected in all three varieties, although their quantities differed considerably. The highest levels of phenolics were detected in the Daniela cultivar.

4. Experimental

4.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade. Sodium hydroxide and acetic and formic acids were from Fluka (Buchs, Switzerland). The organic solvents, methanol, acetonitrile and isopropanol were from Panreac (Barcelona, Spain). Water was doubly deionised with a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA). Solvents used as mobile phase were filtered through a 0.2 µm reinforced, regenerated, cellulose membrane filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany). Metabolite standards available in our laboratory were bought from different sources: naringenin, quercetin, rutin, daidzein, DL-phenylalanine and glutamic, *t*-aconitic, fumaric, malic, citramalic, gentisic, protocatechuic, *p*-coumaric, caffeic and chlorogenic acids were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA); succinic ferulic, ascorbic, quinic and pyroglutamic acids were from Fluka (Buch, Switzerland); kaempferol 3-rutinoside and citric acid were from Extrasynthese (Lyon, France) and Merck (Darmstadt, Germany), respectively.

4.2. Tomato samples

The three tomato varieties analysed, representative of cultivars from Almería (south-east Spain) and selected for their commercial and nutritional properties, were Raf (sweet with green grooves), Rambo (organic, smooth green and half-ripe) and Daniela (smooth red, typical ripe variety, spherical and very juicy). Rambo and Daniela are both long-shelf-life cultivars. Raf is rarely cultivated on a commercial level outside the province of Almería. All the tomatoes were bought at local markets in Almería in the winter of 2008/2009 with no prior knowledge of their cultivation conditions.

4.3. Sample preparation

Each sample (whole fruit) was freeze-dried and ground to a fine powder. Dried tomato powder was weighed in 500 mg lots in a 45-ml polypropylene tube and extracted with methanol (5 ml). Hundred microliter of daidzein (250 mg/l methanol) was added as internal standard. The mixture was sonicated for 1 h at room temperature. After centrifugation, the supernatant was filtered through a 0.45 µm cellulose membrane filter (Symta; Madrid,

Spain) and the precipitate re-extracted twice more following the same steps. The three filtered supernatants were combined, from which 3 ml was evaporated to dryness in a vacuum and the residue re-dissolved in 600 μ l of methanol for analysis. The procedure was repeated in triplicate. Prior to injection into the HPLC apparatus the extract was kept in the freezer at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 days.

4.4. Chromatographic conditions

Chromatography was conducted with an Agilent 1200 Series Rapid Resolution LC (RRLC) system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipped with a vacuum degasser, an autosampler, a diode-array detector (DAD), a binary pump and a thermostated column compartment. Methanol tomato extracts and standards were separated using a reversed-phase C_{18} analytical column ($4.6 \times 150\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$ particle size; ZORBAX Eclipse Plus) protected by a guard cartridge of the same packing, and maintained at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. The injection volume of standards and samples was $10\text{ }\mu\text{l}$. The mobile phase, consisting of deionised water with acetic acid (0.5%) (A) and acetonitrile (B), was pumped at 1.8 ml/min into the HPLC system with the following gradient elution program: 0–2 min, 1–3% B; 2–15 min, 3–9% B; 15–32 min, 9–35% B; 32–39 min, 35–100% B. Subsequently, the B content was decreased to the initial conditions and for 6 min the column was re-equilibrated (total run time 46 min).

4.5. Detection of metabolites by DAD and MS

The HPLC device, equipped with a DAD detector, was connected online to a mass spectrometer. DAD acquired the absorption spectra over the range of 190–950 nm and continuously monitored at wavelengths of 240 and 280 nm.

The effluent from the HPLC system was split using a “T” before being introduced into the mass spectrometer (split ratio 1:8), since 1.8 ml/min was too high for producing a stable ionisation at source. Mass spectral analysis was done with two devices: an orthogonal acceleration time-of flight spectrometer (TOF; micrOTOFTM) and an ion-trap (IT; Esquire 2000TM) mass spectrometer (both from Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), each equipped with an electrospray ionisation source (ESI), which is a soft ionisation technique resulting in (de)protonated molecules that show little or no fragmentation. Since compounds may preferentially ionise in either positive or negative mode, the extracts were analysed sequentially in both modes.

The TOF detector, used for accurate mass measurements, operated in the following parameters in negative-ion mode: nebulizer 2 bars; dry gas flow 9 l/min and temperature $190\text{ }^{\circ}\text{C}$; endplate offset -500 V ; capillary voltage $+3.7\text{ kV}$; mass range 50–1300 m/z . External instrument and post-run internal-mass scale calibrations were made using a 74900-00-05 Cole Palmer syringe pump (Vernon Hills, Illinois, USA) with sodium formate clusters. The SmartFormula tool within DataAnalysisTM was used to obtain the elemental composition of the compounds; this provides a list of potential molecular formulae by combining accurate mass and isotopic distribution, reflected in their error and sigma values, respectively. The error displays the deviation between the measured mass and theoretical mass of the peak in question. The sigma value is an exact numerical comparison between the theoretical and measured isotope patterns and is used to reduce the number of possible formulae produced from the exact mass measurements. The smaller the error and sigma values the better the fit. An error of 3 mDa and mSigma value (sigma value $\times 10^3$) of 50 are generally considered acceptable.

MS/MS measurements were made in the IT detector using a data-dependant mode (autoMS), in which the precursor ion, i.e. the most abundant peak, was automatically selected from the pre-

vious mass scan. Settings in the negative-ion mode were as follows: nebulizer 1.45 bars; dry gas flow 7 l/min and temperature $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; endplate offset -500 V ; capillary voltage $+3\text{ kV}$; mass range 50–1300 m/z ; active MS/MS exclusion after 2 spectra; threshold, absolute 7000 and relative 5%.

4.6. Method validation

We validated our method using MS detection in the negative-ion mode, since this was the main detector used to identify the peak signals. The analytical parameters taken into account were: selectivity, linearity (linear range, calibration curve and determination coefficient), sensitivity (limits of detection and quantification), precision (intraday repeatability and interday reproducibility) and robustness.

An acceptable separation method must be capable of good selectivity, i.e. the ability to determine a particular analyte amongst all the potential sample components. If a method is selective, the influence of potential interferences (matrix effects) on the results obtained is negligible.

The calibration curves were prepared in the concentration range expected for each compound in the tomato samples, ranging from 0.5 to 300 mg/l. Linearity was evaluated on the basis of at least nine point calibration curves constructed by the least-squares method and expressed as the determination coefficient (r^2).

Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined to evaluate the sensitivity of the method. LOD and LOQ were estimated at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively.

Precision was estimated by evaluating intraday and interday repeatability and expressed as relative standard deviation (RSD%) by measuring both peak area and retention time in the MS chromatogram. Intermediate concentration values of the linear range of the 11 standards chosen were used to estimate intraday precision (analyses in triplicate on the same day).

To assess biological, extract and instrument reproducibility, however, studies using the real tomato samples were carried out to identify the same analytes as we did in the standard precision study, except for homogentric acid, which was studied instead of homovanillic acid. Intraday precision was again established, this time by analysing three different methanol extracts of various Daniela tomatoes on the same day ($n = 3$). Interday precision was assayed on six consecutive days using the same tomato extract ($n = 6$).

The robustness of the method was investigated under a variety of conditions, including small, deliberate changes in the following parameters: extraction time, pH of the mobile phase, flow rate, percentage of acetonitrile in the mobile phase, temperature, injection volume and the column itself. Daniela tomato extract was injected in triplicate for every condition, and the assay RSD% (of the 11 phenolic compounds chosen for the reproducibility study) was calculated for each condition.

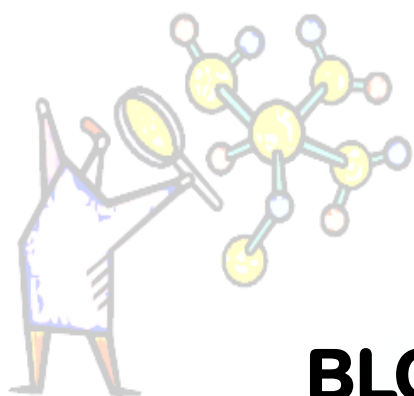
Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education and Sciences (Spain) under the Grant AP-2005-2985, by the Regional Ministry of Sciences and Innovation (Andalusia, Spain) under the Projects P07-AGR-02619 and P09-CTS-4564, and by the Regional Ministry of Agriculture and Fishing (Andalusia, Spain) under Contract 2661. The authors thank their colleague A.L. Tate for revising their English text.

References

- Abad-García, B., Berrueta, L.A., Garmón-Lobato, S., Gallo, B., Vicente, F., 2009. A general analytical strategy for the characterisation of phenolic compounds in

- fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionisation and triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1216, 5398–5415.
- Adato, A., Mandel, T., Mintz-Oron, S., Venger, I., Levy, D., Yativ, M., Domínguez, E., Wang, Z., De Vos, R.C.H., Jetter, R., Schreiber, L., Heredia, A., Rogachev, I., Aharoni, A., 2009. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genetics* 5, 1–23.
- Amin, M.R., Tomita, Y., Onodera, R., 1995. Rapid determination of phenylalanine and its related compounds in rumen fluid by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 663, 201–207.
- Bino, R.J., de Vos, C.H.R., Lieberman, M., Hall, R.D., Bovy, A., Jonker, H.H., Tikunov, Y., Lommen, A., Moco, S., Levin, I., 2005. The light-hyperresponsive high pigment-2(dg) mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytol.* 166, 427–438.
- Buescher, J.M., Moco, S., Sauer, U., Zambon, N., 2010. Ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for fast and robust quantification of anionic and aromatic metabolites. *Anal. Chem.* 82, 4403–4412.
- Bushway, R.J., Perkins, L.B., Paradis, L.R., Vanderpan, S., 1994. High-performance liquid chromatographic determination of the tomato glycoalkaloid, tomatine, in green and red tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2824–2829.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R.D., de Vos, R.C.H., 2008. Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *J. Agric. Food Chem.* 56, 964–973.
- Carrari, F., Baxter, C., Usadel, B., Urbanczyk-Wochniak, E., Zanor, M.I., Nunes-Nesi, A., Nikiforova, V., Centero, D., Ratzka, A., Pauly, M., Sweetlove, L.J., Fernie, A.R., 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiol.* 142, 1380–1396.
- Clifford, M.N., Wu, W., Kirkpatrick, J., Kuhnert, N., 2007. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC–MSn. *J. Agric. Food Chem.* 55, 929–936.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell publishing Ltd., Oxford (UK), pp. 1–24.
- Davidek, T., Kraehenbuehl, K., Devaud, S., Robert, F., Blank, I., 2005. Analysis of Amadori compounds by high-performance cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 140–147.
- Davies, J.N., Hobson, G.E., 1981. The constituent of tomato fruit – the influence of environment, nutrition and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 205–280.
- Delaplace, C., Frettinger, P., Ghanem, M.E., Blondiaux, A., Bauwens, J., Cotton, S., De Clerck, C., Dewalque, A., Guy, J., Heuze, F., Massoz, A., Tassinon, T., van Aubel, G., du Jardin, P., Fauconnier, M.L., 2009. Lipoxygenase pathway and antioxidant system in salt stressed tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 13, 529–536.
- Demirbas, A., 2010. Oil, micronutrient and heavy metal contents of tomatoes. *Food Chem.* 118, 504–507.
- Dorais, M., Ehret, D.L., Papadopoulou, A.P., 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem. Rev.* 7, 231–250.
- Dumas, Y., Dadomo, M., DiLucca, G., Grolier, P., 2003. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *J. Sci. Food Agric.* 83, 369–382.
- Dunn, W.B., Overy, S., Quick, W.P., 2005. Evaluation of automated electrospray-TOF mass spectrometry for metabolic fingerprinting of the plant metabolome. *Metabolomics* 1, 137–148.
- FAO STAT Statistic Division, January, 2010. Available from: <<http://faostat.fao.org/>>.
- Fernández-Panchon, M.S., Villano, D., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2008. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 649–671.
- Ferreres, F., Taveira, M., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., 2010. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2854–2861.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48, 155–171.
- Gautier, H., Diakou-Verdin, V., Bénard, C., Reich, M., Buret, M., Bourgaud, F., Poëssel, J.L., Caris-Veyrat, C., Génard, M., 2008. How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *J. Agric. Food Chem.* 56, 1241–1250.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 317–331.
- Gómez-Romero, M., Arráez-Román, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2007. Analytical determination of antioxidants in tomato: typical components of the Mediterranean diet. *J. Sep. Sci.* 30, 452–461.
- Guil-Guerrero, J.L., Reboloso-Fuentes, M.M., 2009. Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *J. Food Compos. Anal.* 22, 123–129.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Helmja, K., Vaher, M., Püssa, T., Raudsepp, P., Kaljurand, M., 2008. Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanum lycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Electrophoresis* 29, 3980–3988.
- Hounsborne, N., Hounsborne, B., Tomos, D., Edwards-Jones, G., 2008. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J. Food Sci.* 73, R48–R65.
- Iijima, Y., Nakamura, Y., Ogata, Y., Tanaka, K., Sakurai, N., Suda, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Okazaki, K., Kitayama, M., Kanaya, S., Aoki, K., Shibata, D., 2008a. Metabolite annotations based on the integration of mass spectral information. *Plant J.* 54, 949–962.
- Iijima, Y., Suda, K., Suzuki, T., Aoki, K., Shibata, D., 2008b. Metabolite profiling of chalcones and flavanones in tomato fruit. *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 77, 94–102.
- Ikeda, R., Nishimura, M., Sun, Y., Wada, M., Nakashima, K., 2008. Simple HPLC–UV determination of nucleosides and its application to the authentication of Cordyceps and its allies. *Biomed. Chromatogr.* 22, 630–636.
- Lazos, E.S., Tsaknis, J., Lalas, S., 1998. Characteristics and composition of tomato seed oil. *Grasas y aceites* 49, 440–445.
- Le Gall, G., Colquhoun, I.J., Davis, A.L., Collins, G.J., Verhoeven, M.E., 2003. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using ¹H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2447–2456.
- Long, M., Millar, D.J., Kimura, Y., Donovan, G., Rees, J., Fraser, P.D., Bramley, P.M., Bolwell, G.P., 2006. Metabolite profiling of carotenoid and phenolic pathways in mutant and transgenic lines of tomato: identification of a high antioxidant fruit line. *Phytochemistry* 67, 1750–1757.
- Marconi, O., Floridi, S., Montanari, L., 2007. Organic acids profile in tomato juice by HPLC with UV detection. *J. Food Qual.* 30, 253–266.
- Miller, N.J., Ruiz-Larrea, M.B., 2002. Flavonoids and other plant phenols in the diet: their significance as antioxidants. *J. Nutr. Environ. Med.* 12, 39–51.
- Ministry of Environment, Agrarian and Marine Sectors of Spain, 2010. Studies and Reports Related to Food Prices, Available from: http://www.mapa.es/ministerio/pags/observatorio/pdf/estudios/Estudio_Tomate.pdf.
- Mintz-Oron, S., Mandel, T., Rogachev, I., Feldberg, L., Lotan, O., Yativ, M., Wang, Z., Jetter, R., Venger, I., Adato, A., Aharoni, A., 2008. Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiol.* 147, 823–851.
- Moco, S., Bino, R.J., Vorst, O., Verhoeven, H.A., de Groot, J., van Beek, T.A., Vervoort, J., de Vos, C.H.R., 2006. A liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* 144, 1205–1218.
- Moco, S., Capanoglu, E., Tikunov, Y., Bino, R.J., Boyacioglu, D., Hall, R.D., Vervoort, J., de Vos, C.H.R., 2007. Tissue specialisation at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. *J. Exp. Bot.* 58, 4131–4136.
- Moco, S., Forshed, J., de Vos, C.H.R., Bino, R.J., Vervoort, J., 2008. Intra- and inter-metabolite correlation spectroscopy of tomato metabolomics data obtained by liquid chromatography–mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Metabolomics* 4, 202–215.
- Morvai, M., Molnar-Perl, I., 1992. Simultaneous gas chromatographic quantitation of sugars and acids in citrus fruits, pears, bananas, grapes, apples and tomatoes. *Chromatographia* 34, 502–504.
- Mounet, F., Lemarie-Chamley, M., Maucourt, M., Cabasson, C., Giraudel, J.L., Deborde, C., Lessire, R., Gallishci, P., Bertrand, A., Gaudillère, M., Rothan, C., Rolin, D., Moing, A., 2007. Quantitative metabolic profiles of tomato flesh and seeds during fruit development: complementary analysis with ANN and PCA. *Metabolomics* 3, 273–288.
- Osman, S.F., Gerard, H.C., Fett, W.F., Moreau, R.A., Dudley, R.L., 1995. Method for the production and characterization of tomato cutin oligomers. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2134–2137.
- Peng, Y., Zhang, Y., Ye, J., 2008. Determination of phenolic compounds and ascorbic acid in different fractions of tomato by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1838–1844.
- Porretta, S., 1992. Chromatographic analysis of Maillard reaction products. *J. Chromatogr. A* 624, 211–219.
- Rochfort, S., 2005. Metabolomics reviewed: a new “omics” platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J. Nat. Prod.* 68, 1813–1820.
- Sanz, M.L., Dolores del Castillo, M., Corzo, N., Olano, A., 2000. Presence of 2-furoylmethyl derivatives in hydrolysates of processed tomato products. *J. Agric. Food Chem.* 48, 468–471.
- Schindler, M., Solar, S., Sontag, G., 2005. Phenolic compounds in tomatoes. Natural variations and effect of gamma-irradiation. *Eur. Food Res. Technol.* 221, 439–445.
- Slimestad, R., Fossen, T., Verheul, M.J., 2008. The flavonoids of tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2436–2441.
- Slimestad, R., Verheul, M., 2009. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1255–1270.
- Wang, C., Chin, C.K., Gianfagna, T., 2000. Relationship between cutin monomers and tomato resistance to powdery mildew infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57, 55–61.
- Willcox, J.K., Catignani, G.L., Lazarus, S., 2003. Tomatoes and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 1–18.
- Yamanaka, T., Vincken, J.P., de Waard, P., Sanders, M., Takada, N., Gruppen, H., 2008. Isolation, characterisation, and surfactant properties of the major triterpenoid glycosides from unripe tomato fruits. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11432–11440.



BLOQUE TEMÁTICO IV

**DESARROLLO DE UNA BASE DE
DATOS DE ESPECTROS DE MASAS
PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS**



CAPÍTULO 6

IDENTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN ALIMENTOS USANDO UNA BASE DE DATOS DE ESPECTROS DE MASAS

El acoplamiento HPLC-ESI-MS se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en la caracterización de compuestos fenólicos presentes en matrices vegetales. Dada la gran variedad de este tipo de compuestos existentes en la naturaleza, especialmente si se tiene en cuenta el gran número de derivados posibles, su identificación mediante MS resulta un proceso manual tedioso que consume mucho tiempo, y que puede facilitarse y agilizarse mediante el empleo de bases de datos de espectros de masas (MS).

Aunque existen varias bases de datos de libre acceso disponibles en internet, de momento ninguna permite realizar búsquedas automáticas de los espectros obtenidos experimentalmente. Por este motivo, se consideró interesante llevar a cabo la puesta a punto de un método para la identificación rápida y robusta de compuestos fenólicos en alimentos de origen vegetal, basado en la búsqueda automática en una base de datos de espectros MS. El analizador de masas utilizado fue un Qq-TOF, que ofrece exactitud de masa y distribución isotópica verdadera, tanto en el espectro MS como en el de masas/masas (MS/MS), lo que lo convierte en un sistema de detección muy atractivo que facilita la elucidación estructural.



Figura 6.1. Sistema HPLC-ESI-Qq-TOF empleado para la identificación automática de compuestos

El desarrollo del método para la detección automática de compuestos mediante HPLC-ESI-Qq-TOF constó de los siguientes pasos:

1. Establecimiento del método cromatográfico y de las condiciones ESI-MS óptimas para la detección y fragmentación de los compuestos fenólicos.
2. Análisis de los estándares (ácidos fenólicos y flavonoides) a incluir en la base de datos usando el método optimizado, tanto en polaridad negativa como positiva. Los 39 compuestos seleccionados son de los más abundantes encontrados en matrices vegetales y están disponibles comercialmente.
3. Comprobación de los espectros de MS y MS/MS obtenidos, ya que deben cumplir una serie de requisitos para poder ser añadidos a la base de datos (relativos a valores de intensidad, masa exacta y distribución isotópica).
4. Si cumplen los requisitos, adición de los espectros a la base de datos; si no, repetición de la medida a distintos valores de concentración.
5. Construcción de la base de datos usando el tiempo de retención y los espectros de MS y MS/MS en modo negativo y positivo (en el futuro podrán también añadirse los espectros UV-Vis); cada entrada de la base de datos contiene, además, información relativa al compuesto y las condiciones de MS en las que se realizó la adquisición (*figura 6.2*).

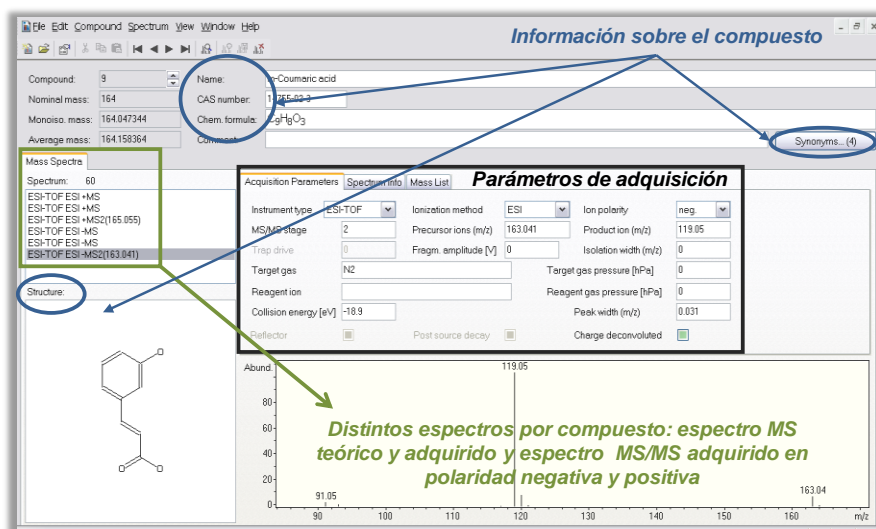


Figura 6.2. Ejemplo de una entrada en la base de datos (ácido *m*-coumárico), destacando la información que contiene: información sobre el compuesto, parámetros de adquisición y distintos espectros

6. Extracción de los compuestos fenólicos de las muestras y análisis de los extractos usando las mismas condiciones utilizadas para analizar los estándares.

7. Identificación automática de compuestos utilizando la base de datos. Los parámetros de búsqueda son establecidos por el usuario; el software compara el tiempo de retención y los espectros de MS y MS/MS obtenidos al analizar las muestras, con los que contiene la base de datos, y genera un informe con las posibles identificaciones.

La potencialidad del método se demostró analizando diversos ingredientes de origen vegetal (borraja, cebolla, ajo, limón, col, brócoli y propóleo) de un complemento alimenticio llamado “*Verbivital + propóleo*”, de Verbionat (empresa con la que nuestro grupo de investigación mantenía una estrecha colaboración).

A pesar del limitado número de compuestos introducidos en la base de datos, pudieron identificarse con éxito varios ácidos fenólicos y flavonoides en los extractos. El propóleo fue el ingrediente en el que se identificó un mayor número de compuestos fenólicos en polaridad negativa, un total de 9 (ácidos gálico, protocatechuico, dihidrocafeico, clorogénico, cafeico, *p*-coumárico y ferúlico, quercetina y crisina; cromatogramas incluidos en el trabajo publicado que se adjunta a continuación). De esos 9, sólo fue posible detectar 6 en polaridad positiva (ácidos clorogénico, cafeico, *p*-coumárico y ferúlico, y quercetina y crisina; **figura 6.3**), ya que, excepto la crisina, todos ellos se ionizan peor en esta polaridad. La quercetina fue el único compuesto identificado en los extractos de todos los ingredientes analizados.

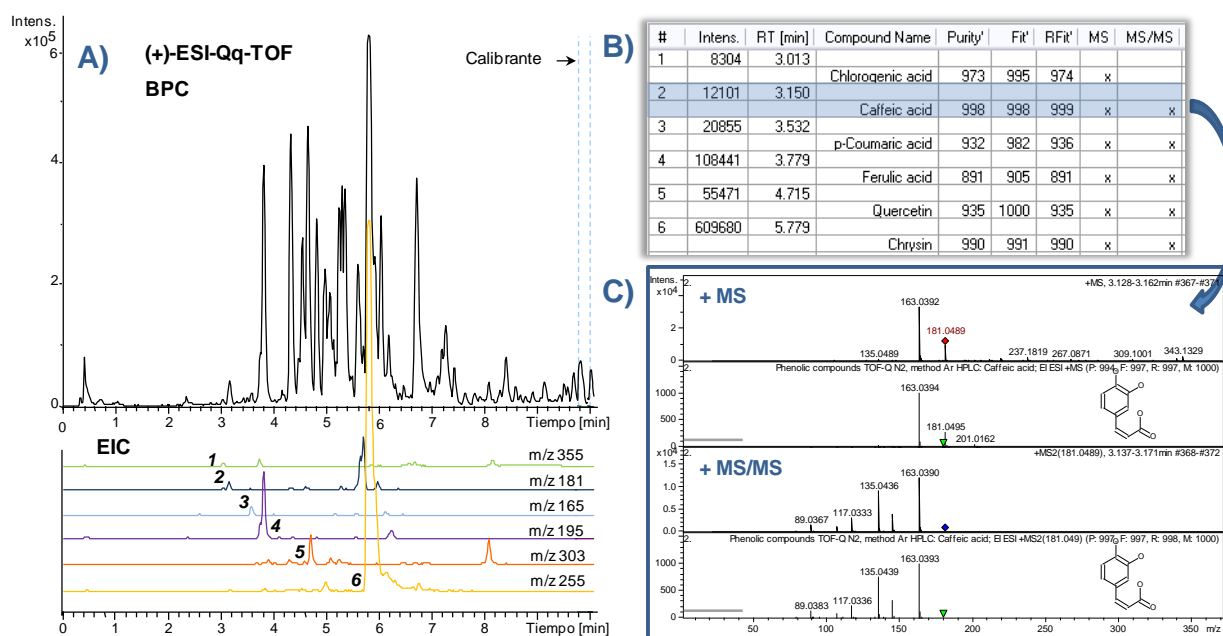


Figura 6.3. A) Cromatograma del pico base (BPC, en negro) del propóleo en polaridad positiva y cromatogramas de los iones extraídos (EIC, en colores) de los compuestos identificados; **B)** Lista final de compuestos identificados obtenida tras la búsqueda automática en el base de datos; **C)** Identificación del pico #2 como ácido cafeico, espectros de masas de la muestra y del compuesto asignado por la base de datos

Además, en este capítulo se incluye una discusión acerca del tiempo de retención y de las fragmentaciones (obtenidas mediante ESI-Qq-TOF) de todos los compuestos fenólicos incluidos en la base de datos, tanto en polaridad negativa (datos recogidos dentro del trabajo publicado) como en polaridad positiva (datos recogidos en el anexo, ya que, debido a su extensión no se incluyeron en la publicación). Una técnica de ionización suave, como es la ESI, produce principalmente iones protonados y desprotonados en el espectro de MS en polaridad positiva y negativa, respectivamente, que serán los iones precursores para obtener el espectro MS/MS. El análisis de estos espectros revela que cada grupo exhibe un patrón de fragmentación característico. Un conocimiento en profundidad de los patrones de fragmentación de las distintas familias de compuestos fenólicos facilitará la identificación de los compuestos desconocidos.

El trabajo experimental de este bloque temático fue realizado durante una estancia en la sede de la empresa Bruker Daltonik GMBH en Bremen, Alemania.

Este trabajo se ha publicado en la revista *Food Chemistry* bajo el título “***Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach***”.



Analytical Methods

Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach

María Gómez-Romero^a, Gabriela Zurek^b, Birgit Schneider^b, Carsten Baessmann^b, Antonio Segura-Carretero^{a,*}, Alberto Fernández-Gutiérrez^{a,**}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain

^b Bruker Daltonik GmbH, Fahrenheitstr. 4, 28359 Bremen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2009

Received in revised form 18 November 2009

Accepted 9 June 2010

Keywords:

Library search

HPLC

ESI-Qq-TOF

Dietary phenolic compounds

ABSTRACT

Phenolic compounds may contribute to the organoleptic, commercial and nutritional characteristics of plant-derived food and beverages and their consumption has been associated with positive health benefits. Consequently, it is essential to determine the nature and distribution of these compounds in the diet. We have developed a reliable, reproducible, fast and sensitive method for the identification of phenolics using liquid chromatography interfaced to an ESI-Qq-TOF mass spectrometer, which provides mass accuracy and true isotopic pattern in MS and MS/MS. We built up a library of phenolic compounds using retention time, MS and MS/MS spectra. Fragmentation patterns in the negative ionisation mode are discussed. We have applied the automated library search in some of the components of a food supplement (propolis and lyophilisate of some vegetables) selected by its antioxidant properties. A variety of phenolic components was successfully identified.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phenolic compounds are secondary metabolites synthesized by plants both during normal development and in response to stress conditions (Naczek & Shahidi, 2006). Their level in plant sources depends on factors such as variety, environmental factors, cultivation techniques, as well as processing and storage conditions (Manach, Scalbert, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004). They have great importance in the organoleptic, commercial and nutritional properties of plant-derived food and beverages (Bravo, 1998), contributing to their oxidative stability. Furthermore, consumption of phenolic compounds has been associated with positive health benefits (Kondratyuk & Pezzuto, 2004; Yao et al., 2004), that will depend on the amount consumed and their bioavailability (Manach et al., 2004). In many cases, eating the recommended amounts of these compounds is insufficient or inadequate and food supplements could be a way to compensate these deficiencies. Detailed knowledge of the phenolic compounds consumed will contribute to a better understanding of their influence on biological properties and for this purpose, suitable methods need to be established. However, this is not an easy task and could be very time-consuming. Building up an extensive library for phenolic compounds un-

der standardised experimental conditions would facilitate and speed up their identification.

The coupling of liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) has proved to be a very useful tool in natural products characterisation (Careri, Bianchi, & Corradini, 2002; Careri, Mangia, & Musci, 1998; Lin & Harnly, 2007; Xing, Xie, & Lou, 2007). Electro-spray ionisation (ESI), in particular, has been widely applied, as it is a soft ionisation technique resulting in (de)protonated molecules. Accurate mass measurement of small molecules is used to determine elemental formula enabling identification of unknown substances. Sometimes, because of coeluting compounds in real samples or the inability of MS to distinguish between isobaric substances, structural information may be needed and has to be obtained via MS/MS by means of collision-induced dissociation (CID). Modern hybrid quadrupole time-of-flight (QqTOF) mass spectrometers combine high sensitivity and high mass accuracy for both precursor and product ions (Chernushevich, Lobota, & Thomson, 2001). Recent advancements in TOF technology, especially moving towards analog to digital converter (ADC) in the detector design, have overcome the dependency of mass accuracy on signal intensity. This results in an increase in the dynamic range needed for the analysis of complex samples (Hofstadler, Drader, & Schink, 2006; Raether, Schubert, Stoermer, Suetering, & Pelzing, 2004).

In spite of the progress that has been made, developing a comprehensive database and performing true library analysis are not easy tasks due to several issues: the large number of phenolics and dietary sources, the analysis of every compound under the

* Corresponding author. Fax: +34 9 58249510.

** Corresponding author.

E-mail addresses: ansecura@ugr.es (A. Segura-Carretero), albertof@ugr.es (A. Fernández-Gutiérrez).

same conditions, the inclusion of the generated spectra into the library, the acquisition of reproducible spectra and ion ratios amongst different instrument platforms, the lack of routine programmes for the rapid screening of samples and the need for an estimation of the probability of the correct identification (Ferrer, Fernández-Alba, Zweigenbaum, & Thurman, 2005). However, these drawbacks are outweighed by the reliable identification of compounds (Fredenhagen, Derrien, & Gassmann, 2005). Currently, several LC–MS/MS libraries exist but, to our knowledge, only three of them are of phenolic compounds. They were applied for the identification of unknown compounds in wine (Sun, Liang, Bin, Li, & Duan, 2007), ripe tomato fruit (Moco et al., 2006) and biological samples (Lee, Kim, Liu, Oh, & Lee, 2005).

The goal of the present work is the development of a fast and reliable method for the automated identification of phenolic compounds based on accurate mass library using a QqTOF mass spectrometer. Fig. 1 shows the workflow of the developed method. The automation of the method includes the acquisition of MS and MS/MS data in a single LC run and the automated library search. A report with the identified compounds is generated and their identification can be confirmed using their mass accuracy and isotopic pattern information for formula generation.

The applicability of the automated method was demonstrated by analysing some of the ingredients of a dietary supplement. These ingredients are mostly freeze-dried concentrates from vegetables rich in antioxidants and propolis and no complicated treatment before the analysis was required. The antiaging food supplement was selected because of its antioxidant properties (Alcalá et al., 2005).

On the other hand, a brief discussion of the fragmentation patterns in the negative mode is presented, in order to be able to correlate those patterns with the structural characteristics. The data was verified with the published work of other researchers. This study may facilitate the identification of unknown phenolic compounds not included in the library.

2. Experimental

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade and used as received. Sodium hydroxide and formic acid were from Fluka (Buchs, Switzerland), and acetic acid from Merck (Darmstadt, Germany). The organic solvents, methanol, acetonitrile and 2-propanol were from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Deionised water was obtained from a water purifier system (USF^{ELGA} from Purelab Plus, Ransbach-Baumbach, Germany). Phenolic compound standards

were purchase from different sources including Sigma, Aldrich, Fluka and Extrasynthese (Lyon, France).

2.2. Sample preparation

Standards were dissolved in methanol at different concentrations.

The selected dietary supplement contains propolis, lemon, borage, cabbage-broccoli, garlic and onion, amongst others. Those ingredients were analysed separately and prepared by extracting 5 g of powdered freeze-dried material with 5 ml of 80% methanol for 5 min in an ultrasonic bath, and then centrifuged 5 min (4000 rpm). The extracts were filtered and diluted (1:1) with the same solvent used to start the LC gradient.

2.3. Chromatography

The Agilent 1100 series HPLC instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was equipped with a vacuum degasser, an autosampler, a diode-array detector (DAD), a binary pump, and a thermostated column department. Standards and samples were analysed using a reversed-phase C₁₈ analytical column (50 × 2 mm, 2.5 μm particle size; Phenomenex Synergi Fusion-RP100A) with a SecurityGuardTM C₁₈ guard column (4 × 2 mm; Phenomenex Fusion-RP) maintained at 35 °C. The injection volume was 5 μL. The mobile phase consisted of deionised water (A) and acetonitrile (B), each containing 0.1% (v/v) formic acid. The flow rate was 0.5 mL/min split in a 1:3 ratio before being introduced into the mass spectrometer. The chromatographic method consisted of a linear gradient from 1 to 100% B during 9.5 min. The total run time, including the conditioning of the column, was 13 min. The wavelength of the DAD detector was set at 254 nm and the on-line UV/Vis spectra were recorded in the range 190–950 nm.

2.4. Mass spectrometry

The mass spectrometry was performed on a quadrupole orthogonal acceleration time-of flight mass spectrometer (microTOF-QTM, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionisation source (ESI). Spectra of both positive and negative ion modes of all the compounds were acquired and added to the library. The typical operating parameters in positive ion mode (voltage values are set depending on the polarity) were as follows: nebulizer, 2 bar; dry gas flow 7 L/min and temperature 200 °C; endplate offset -500 V; capillary voltage 4000 V; ion energy 5 eV; collision energy (COEY) 7 eV; scan range 50–800 m/z; acquisition rate 2 Hz. COEY values for fragmentation were adjusted as follows: m/z 100, 17 eV; m/z 200, 20 eV; m/z 300, 25 eV; m/z 500, 29 eV; m/z 600, 32 eV; m/z 800, 35 eV. The drying, nebulizing and collision gases were nitrogen.

External instrument and post-run internal mass scale calibrations were performed using a 74900–00-05 Cole Palmer syringe pump (Vernon Hills, Illinois, USA) with sodium formate acetate clusters (5 mM sodium hydroxide in water/isopropanol 1/1 (v/v), with 0.2% (v/v) of formic and acetic acids) in quadratic + high precision calibration (HPC) regression mode.

Acquisition and analysis of data were performed with Compass for microTOF series software (version 1.2 SR1, Bruker Daltonik GmbH). All library building and searching operations were conducted using DataAnalysisTM and LibraryEditorTM (Bruker Daltonik GmbH).

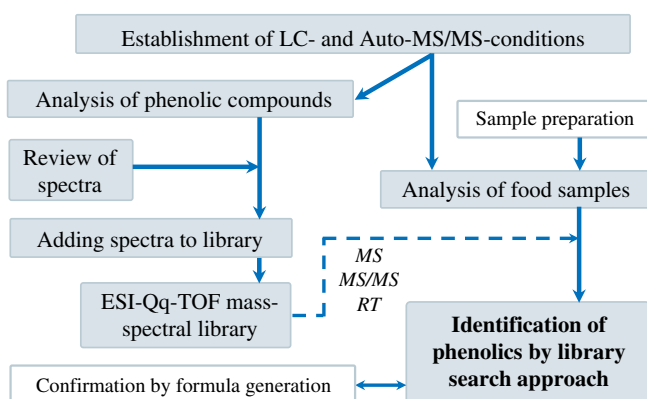


Fig. 1. Library development and identification workflow.

Table 1
Retention times and spectral information of the studied phenolic compounds.

Compound	Formula	RT (min)	Negative mode		
			[M–H] [−] (%)	CID in MS (%)	MS/MS ions (%)
<i>Hydroxybenzoic acids and derivatives</i>					
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	1.63	169.0149 (100)	125.0240 (16)	125.0241 (100); 97.0278 (6)
Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	3.02	153.0201 (100)	109.0288 (21)	109.0282 (64); 108.0209 (100)
Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	2.43	153.0195 (100)	109.0288 (31)	109.0292 (100); 108.0222 (13)
Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	3.96	137.0256 (100)	93.0341 (52)	93.0341 (100)
Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	3.27	197.0465 (100)	No	182.0219 (100); 166.9987 (98); 138.0316 (18); 123.0087 (90)
Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	3.14	167.0355 (100)	152.0113 (42); 123.0447 (10)	152.0113 (100); 123.0439 (5); 108.0210 (70)
2,4-Dihydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄	3.26	153.0199 (100)	109.0292 (18)	109.0291 (100); 67.0174 (5)
3-Methoxy benzoic acid	C ₈ H ₈ O ₃	4.32	151.0402 (100)	No	108.0208 (100); 92.0251 (57); 93.0334 (100)
4-Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	2.94	137.0245 (100)	93.0332 (56)	
<i>Cinnamic acids and derivatives</i>					
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	3.24	179.0354 (100)	135.0449 (20)	135.0454 (100)
Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.07	353.0875 (100)	191.0561 (33)	191.0564 (100)
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	3.80	193.0512 (100)	178. (14); 149.0604 (8); 134. (7)	178.0265 (33); 149.0578 (5); 137.0240 (17); 134.0375 (100)
<i>m</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	3.88	163.0406 (100)	119.0501 (34)	119.0506 (100); 91.0536 (3)
<i>o</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	4.07	163.0400 (100)	119.0500 (90)	119.0500 (100); 93.0325 (2)
<i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	3.63	163.0409 (100)	119.0505 (90)	119.0506 (100); 93.0331 (1)
Sinapic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	3.85	223.0621 (100)	208.0380 (10)	208.0380 (53); 193.0145 (100); 164.0475 (43); 163.0400 (20); 149.0243 (78)
trans-Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	4.69	147.0449 (100)	103.0541 (3)	119.0494 (16); 103.0541 (80)
Dihydrocaffeic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	3.00	181.0523 (100)	137.0609 (11)	154.0271 (7); 137.0604 (100); 135.0452 (43); 121.0295 (85); 119.0507 (28); 109.0319 (72)
<i>Other phenolic compounds</i>					
Homovanillic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	3.22	181.0520 (100)	137.0599 (9)	154.0275 (49); 137.0592 (100); 122.0367 (69); 107.0483 (7)
DOPAC	C ₈ H ₈ O ₄	2.34	167.0360 (100)	123.0455 (56)	123.0448 (100); 95.0491 (7)
4-hydroxy phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	2.92	151.0414 (100)	107.0495 (10)	123.0453 (17); 107.0495 (100); 93.0332 (8)
Ellagic acid	C ₁₄ H ₆ O ₈	3.80	300.9998 (100)	No	283.9947 (22); 257.0080 (11); 245.0080 (23); 229.0132 (36); 217.0130 (8); 201.0189 (26); 185.0240 (25); 173.0242 (22); 157.0292 (9); 145.0292 (17); 129.0333 (5); 117.0346 (4)
Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	3.49	151.0409 (95)	136.0174 (100); 108.0212 (4)	136.0171 (100); 108.0213 (16)
Tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	2.73	137.0612 (100)	119.0498 (5); 106.0414 (2)	119.0498 (55); 106.0416 (43); 93.0329 (16); 81.0332 (3)
<i>Flavones and glycosides</i>					
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5.14	269.0455 (100)	No	225.0534 (6); 159.0445 (8); 151.0031 (37); 149.0238 (25); 117.0341 (100); 107.0132 (23)
Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5.92	253.0511 (100)	No	209.0605 (23); 181.0607 (13); 145.0297 (36); 143.0500 (83); 119.0504 (29); 107.0136 (41)
Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	4.76	285.0403 (100)	No	199.0387 (8); 175.0396 (12); 151.0029 (33); 133.0290 (100); 107.0128 (15)
Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	3.81	447.0924 (100)	No	285.0398 (100)
<i>Flavonols and glycosides</i>					
Kaempferide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	6.06	299.0558 (100)	No	284.0302 (100); 169.0139 (33); 164.0111 (34); 151.0032 (95); 132.0210 (22); 107.0129 (40)
Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	4.28	317.0295 (100)	No	178.9983 (87); 151.0031 (100); 137.0236 (58); 107.0126 (6)
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	4.76	301.0356 (100)	No	273.0402 (9); 179.9988 (43); 151.0035 (100); 121.0293 (20); 107.0130 (11)
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	3.73	609.1455 (100)	No	300.0273 (100)
<i>Flavanones and glycosides</i>					
Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	3.94	609.1813 (100)	No	301.0716 (100)
Isosakuranetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	5.94	285.0765 (100)	No	270.0519 (11); 243.0651 (14); 196.0007 (16); 164.0109 (29); 151.0030 (11); 107.0132 (4)
Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	5.11	271.0613 (100)	No	177.0187 (9); 151.0033 (100); 119.0500 (55); 107.0128 (16);

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compound	Formula	RT (min)	Negative mode		
			[M–H] [–] (%)	CID in MS (%)	MS/MS ions (%)
Flavan-3-ols (+)-Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	2.99	289.0720 (100)	No	93.0327 (7) 245.0813 (79); 221.0823 (65); 205.0512 (54); 203.0705 (89); 151.0401 (63); 137.0243 (50); 125.0243 (91); 123.0243 (91); 109.0292 (100)
(–)-Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	3.26	289.0721 (100)	No	245.0816 (83); 221.0815 (62); 205.0504 (60); 203.0706 (91); 151.0395 (68); 137.0240 (59); 125.0235 (100); 123.0440 (74); 109.0288 (99)
Isoflavone Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5.09	269.0464 (100)	No	159.0443 (21); 135.0405 (16); 133.0290 (52); 107.0130 (17)
Flavanolol (+)-Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	3.85	303.0515 (100)	285.0405 (13); 125.0239 (3)	285.0395 (16); 153.0194 (16); 125.0243 (100)

3. Results and discussion

3.1. Method development

The developed LC-method is fast and comprises a wide polarity range, enabling the detection of all phenolic compounds within 9.5 min. MS conditions were optimised to provide strong mass signals for all compounds and their fragments. It was possible to acquire MS and MS/MS data of each compound in a single LC run, thereby saving on analysis time, by means of the automated MS/MS mode, which is a data-dependent scan mode that uses criteria from the previous MS scan to select the target precursor peak. The preferred precursor ion was the most abundant detected in the MS spectra.

When operating in MS/MS mode, the isolated parent masses are fragmented using a neutral collision gas, typically nitrogen or argon, introduced in the collision cell at about 10^{–2} mbar. Both inert gases were tested and comparison of MS/MS spectra from both collision gases indicate that fragment ions most often have the same *m/z* values, although the ratios differ widely for many compounds. Argon produced higher CID than nitrogen due to the larger collision cross-section of argon and consequently nitrogen was chosen as collision gas.

The choice of the optimum COEY affects significantly the abundance and also the type of ions generated in the spectra (Wolfender et al., 2008). To transfer the ions it is necessary to have a COEY value between 5 and 7 eV. In order to have a higher transference we chose 7 eV, albeit for the most labile ions the CID in MS spectra was very significant. On the other hand, the higher *m/z* range, the higher COEY required to induce fragmentation. Therefore different values of energy were applied according to the *m/z* value of the different compounds.

Postrun internal mass scale calibration was enabled by injecting the calibration solution at the end of each run in view of the fact that injecting the calibration solution at the beginning of the run resulted in higher sodium adducts [M+Na]⁺ in the positive mode.

3.2. Library development and search parameters

An initial set of MS and MS/MS mass spectra of 39 of the most common phenolic compounds found in food sources was obtained. The selected compounds showed stronger response in the negative ion mode than in the positive. However, they could be complemen-

tary for identification and spectra of both modes were acquired and added to the library. The library database can be readily updated, and new spectra can easily be added directly to the programme. Furthermore, UV/vis data have been also recorded and are available from the files. In the future it could be as well included in the software library.

The soft ionisation technique used yielded (de)protonated molecules for all the phenolic compounds studied (except tyrosol, which did not produce [M+H]⁺ in the positive mode). Therefore, they were the preferred precursor ions for the MS/MS analysis. However, for some phenolic acids, ions resulting from losses of small molecules, such as water or carbon dioxide, were more prominent and were also taken as precursor ions, adding also these spectra to the library. On the other hand, some compounds, such as ellagic acid and most flavonoids, could not be totally fragmented and analysis were repeated at higher values in both ion modes, in order to have a larger number of characteristic fragment ions in the MS/MS spectra (the larger number of characteristic fragments, the higher certainty of identifying a compound based on its MS/MS spectrum).

During spectra review for library generation, special emphasis was given to mass accuracy and isotopic pattern, reflected in the accepted error and sigma values, for both MS and MS/MS spectra. An important point here is having appropriate intensity values (spectra were not acquired at the lower/upper detection limits), which in turn meant that standards were analysed at different concentrations.

The mass-spectral library has the following features:

- Spectra are stored with all significant properties: compound related information and acquisition parameters.
- Multiple spectra per compound: precursor (measured and theoretical) and fragment spectra of both polarities.
- Spectra are stored with full mass precision – not just integer masses.

Library search is performed with an automatic procedure whose parameter settings have to be defined by the user. These settings are automatically stored in the analysis when it is saved. The automated search comprises recalibration, peak detection, library search itself and generation of a report with the identified compounds. AutoMS(n) finding function was employed for the peak detection in the chromatogram (i.e. finding out the different compounds).

Settings for the library search itself include selecting the mass-spectral library/libraries to be searched and their hierarchical order, selecting the scoring scheme used and defining the score values based on which the search should proceed. In addition, retention time constraints can be defined. The maximum retention time deviation accepted was 0.3 min.

When identifying a compound, not only the spectra, but also all significant parameters used to acquire the spectra and the retention time are compared, giving a list of library hits with the corresponding scores. The *fit score* (Fit) reflects how well the masses and intensities of the library spectrum agree with those found in the acquired spectrum, ignoring other masses contained in the acquired spectrum. The *reverse fit score* (RFit) indicates how well the masses and intensities of the acquired spectrum agree with those found in the library spectrum. Finally, the *purity score* (Purity) is a combination of both other values. By comparing the acquisition parameters and the retention time, the *parameter match score* is calculated. The analyst can define the acquisition parameters to be included in calculating this score and how they should be weighted. The *effective scores* Purity', Fit' and RFit' are calculated by combining the individual scores with the parameter match score. The maximum value of all these scores is 1000.

If library search is successful, the corresponding library spectrum is displayed together with the acquired spectrum. Along with each library spectrum, the corresponding effective scores and additional information are shown. After applying a post search filtering to remove the non-identified compounds from the listing of total compounds found, the final list of library identifications is produced.

3.3. Study of chromatographic and spectral behaviour of phenolic standards

3.3.1. Retention behaviour

Retention times are presented in Table 1. Retention, in general, followed the expected reversed-phase pattern of benzoic acids < cinnamic acids < flavonoid glycosides < flavonoid aglycones though there was overlap between compounds of the different classes. Within individual classes of phenolics, elution could be predictable based on the number of hydroxy substituents: e.g. luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxy) < apigenin (5,7,4'-trihydroxy) < chrysin (5,7-dihydroxy), or the number of hydroxy and methoxy substituents: e.g. caffeic acid (3,4-dihydroxy) < *p*-coumaric acid (4-hydroxy) < ferulic acid (4-hydroxy-3-methoxy) < sinapic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxy) < *trans*-cinnamic acid (no substituents). The configurations of the substituents also affect the strengths of the interactions and therefore the order of elution, as it can be seen by comparing the retention times of coumaric acid isomers.

3.3.2. Fragmentation behaviour

The MS/MS analysis in the present study revealed that each group exhibits a characteristic fragmentation pattern. Functional groups have a significant influence on the ionisation and fragmentation paths of individual compounds. Fragmentation behaviour in positive and negative ion modes is different, giving additional information in structural analysis. We have focused the study in the negative ionisation mode since the phenolic compounds included in the library showed stronger response in this mode, suggesting that it is more sensitive. Table 1 shows the spectral information of the studied compounds in the negative ion mode. CID in MS spectra, as well as adduct formation and molecular complexes, were observed for many compounds. However, information about higher *m/z* in MS is not shown in the table.

Hydroxybenzoic acids produced a $[M-H-44]^-$ fragment ion by losing a CO_2 group from the carboxylic acid function. Aside from this loss, methoxylated hydroxybenzoic acids showed the loss of the CH_3 group. Syringic acid and vanillic acid provided $[M-H-15]^-$ anion radical at *m/z* 182 and 152, respectively. Syringic acid also provided significant anion radicals at *m/z* 166 ($[M-H-2CH_3]^-$) and 123 ($[M-H-CH_3-CO_2]^-$). The latter loss was also seen in 3-methoxybenzoic acid (*m/z* 92). As hydroxybenzoic acids, cinnamic acids also lost a CO_2 group, as it can be seen in caffeic, *trans*-cinnamic and the three coumaric acid isomers MS/MS spectra. Only *trans*-cinnamic acid produced a second significant anion radical corresponding to the loss of CO. Coumaric acid isomers had almost identical fragmentation pattern. Nevertheless, in the positive ion mode *o*-coumaric acid fragmented differently. Regarding these isomers, retention time would be a key parameter for their identification in a real sample. When cinnamic acids are methoxylated, such as ferulic and sinapic acids, the demethylated and decarboxylated ions happened as well. Chlorogenic acid, which is the esterified form of caffeic and quinic acids, showed the ion fragment corresponding to the deprotonated quinic acid (*m/z* 191). Hydroxyphenylacetic acids fragmentise alike forementioned acids, although for homovanillic acid the loss of the CH_3 group is not as significant as in the previously mentioned methoxylated acids.

Concerning other phenolic compounds, vanillin exhibited a characteristic ion fragment of *m/z* 136 showing the loss of CH_3 . Tyrosol, a simple phenol, showed the dehydrated molecule $[M-H-H_2O]^-$ (*m/z* 119) as well as the anion $[M-H-CH_2OH]^-$ (*m/z* 106). Ellagic acid is a stable molecule that did not provide important fragments at the settled COEY value. At higher fragmentation voltages, its MS/MS spectrum illustrated a large number of fragmentations coming from subsequent losses of CO and CO_2 .

Flavonoids show many fragmentation pathways which depend strongly on the substitution pattern and the subclass of flavonoid (Cuycckens & Claeys, 2004). Fragment ions can be designated according to the nomenclature proposed by Ma, Li, Van den Heuvel, and Caléis (1997). The $^{i,j}A^-$ and $^{i,j}B^-$ represent product ions containing intact A and B-rings, respectively, in which subscripts *i* and *j* indicate the C-ring bonds that have been broken. The cleavage of the C–C bonds of the C-ring is due to retro Diels–Alder (RDA) reactions. Losses of small neutral molecules, such as H_2O , CO, CO_2 , C_2H_2O may also be prominent.

Three flavone aglycones have been included in the library at both initial and higher COEY. The RDA reactions produced prominent $^{1,3}A^-$ and $^{1,3}B^-$ ions for apigenin and luteolin (Fabre, Rustan, de Hoffmann, & Quetin-Leclercq, 2001; Wu, Yan, Li, Liu, & Liu, 2004). The $^{1,3}A^-$ (*m/z* 151) ion underwent further CO_2 loss leading to an ion at *m/z* 107. The most notable ions for chrysin were $^{1,3}A^-CO_2$ ion, *m/z* 143 (probably coming from the opening of a product ion of the B-ring), and others produced by the loss of small molecules (Hughes, Croley, Metcalfe, & March, 2001). For the hydroxylated flavonols quercetin and myricetin a different retrocyclization pathway led to $^{1,2}A^-$, $^{1,2}A^-CO$ and $^{1,2}A^-CO-CO_2$ fragment ions at *m/z* 179, 151 and 107, respectively (Fabre et al., 2001). Methoxylated flavonol kaempferid primarily lost the methyl group generating abundant $[M-H-CH_3]^-$ (*m/z* 284) and then lost several CO and CO_2 molecules producing minor fragment ions; the second most intense peak of the MS/MS spectra at *m/z* 151 corresponds to $^{1,3}A^-$. Dihydroflavonols (or flavanonols) are isomers of flavanones. Taxifolin (dihydroquercetin) produced an abundant $^{1,2}A^-2CO$ ion (*m/z* 125). The main peaks in the product MS/MS spectrum of flavanone naringenin are $^{1,3}A^-$ (*m/z* 151) and the complimentary ion $^{1,3}B^-$ (*m/z* 119). Different fragment ions were observed for isosakuranetin (4'-methylnaringenin), despite the similar chemical structures of both compounds, having $[M-H]^-$ as base peak in the MS/MS spectrum (Fabre et al., 2001). Flavan-3-ols isomers,

(+)-catechin and (–)-epicatechin, gave the same fragment ions with slightly different abundances, as the stereoisomers could not be distinguished by mass spectrometry. The fragment m/z 245 ($[M-H-44]^-$) could be explained by a neutral loss of CO_2 (Stöggli, Huck, & Bonn, 2004) or by the loss of a $-CH_2-CHOH-$ group (Pérez-Magariño, Revilla, González-SanJosé, & Beltrán, 1999). The ion at m/z 203 is produced by a consecutive loss of C_2H_2O (-42 u) whilst the ion at m/z 205 is probably due to a loss of the A-ring. The formation of the anion at m/z 125, which is considered to be a diagnostic for the presence of two hydroxyl groups on the A-ring (Miketova et al., 2000), was also observed. Isoflavone structures differ from the isomeric flavones only by the position of the B ring at the phenylchroman skeleton. However, they show substantially different fragmentations. The $[M-H]^-$ ion from genistein suffered the loss of small molecules and the C-ring degraded by cleavage of bonds 0/3 to produce $^{0,3}B^-$ (m/z 133) as the main peak whilst apigenin did not show losses of small molecules and its C-ring degraded by cleavage of bonds 1/3.

Glycosylated flavonoids provided solely parent and aglycone ions in both the positive and the negative ion mode. Therefore little structural information with regard to the aglycone part could be obtained from the MS/MS spectra of the glycosides.

3.4. Identification of phenolic compounds using the library search approach in real samples

In order to test our procedures, we further attempted to determine whether the library was applicable to the identification of unknown phenolic compounds in some ingredients of a food supplement. As it has been already commented, using the optimised LC-ESI-MS/MS conditions, phenolic compounds showed stronger response in the negative ion mode than in the positive. Thus, (–)ESI-MS was used to test the library search approach.

Amongst the ingredients of the food supplement, we analysed propolis and concentrates obtained from borage, cabbage-broccoli, garlic, lemon and onion. No complicated sample preparation was needed. These plant-derived products are rich in phenolic compounds, albeit it was not possible to identify all the compounds in the samples since just 39 of the most common phenolic compounds have been added to the spectral library. Propolis was the ingredient in which more phenolic compounds were identified. As a consequence, it has been chosen to illustrate the applicability of the automated method.

The sample has to be injected once to obtain both MS and MS/MS spectra, so less time is needed for the analysis. In spite of the

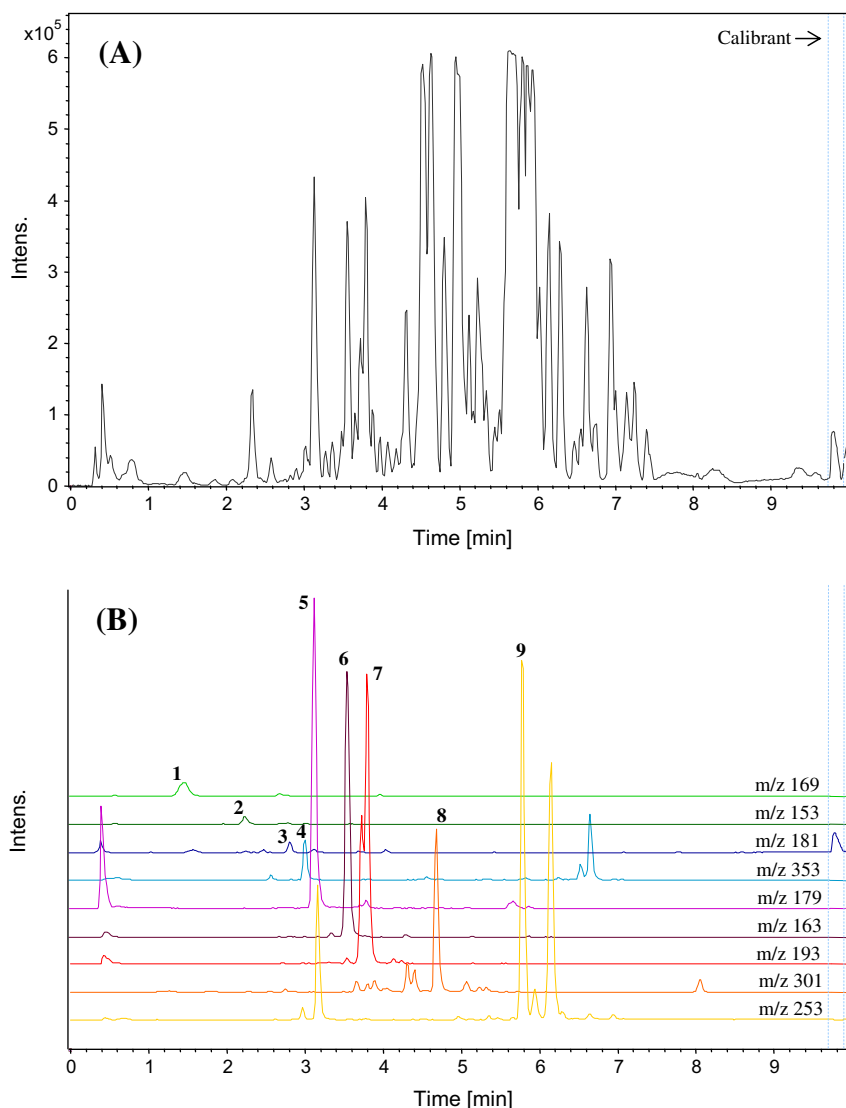


Fig. 2. (A) BPC of propolis extract in the negative ion mode; (B) EIC of identified compounds. Peaks: (1) gallic acid; (2) protocatechuic acid; (3) dihydrocaffeic acid; (4) chlorogenic acid; (5) caffeic acid; (6) *p*-coumaric acid; (7) ferulic acid; (8) quercetin; (9) chrysin.

Table 2

Final list of identified compounds in the propolis sample in the negative polarity: library search result and confirmation of identified compounds by formula generation.

Peak detection			Library search result							Formula generation			
Peak #	RT ^a (min)	Measured <i>m/z</i> : [M–H] [–]	Compound name	Lib RT ^b (min)	Fit'	RFit'	Purity'	MS	MS/MS	Chemical formula	Error ^c		mSigma value ^d
											ppm	mDa	
1	1.39	169.0142	Gallic acid	1.63	996	874	870	x	x	C ₇ H ₆ O ₅	0.3	0.05	7.7
2	2.25	153.0197	Protocatechuic acid	2.43	999	891	891	x	x	C ₇ H ₆ O ₄	–2.1	–0.32	12.8
3	2.83	181.0505	Dihydrocaffeic acid	3.00	981	932	930	x	x	C ₉ H ₁₀ O ₄	0.6	0.11	21.6
4	3.02	353.0869	Chlorogenic acid	3.07	998	971	971	x	x	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2.7	0.96	17.4
5	3.12	179.0359	Caffeic acid	3.24	1000	997	997	x	x	C ₉ H ₈ O ₄	–5.2	–0.94	0.2
6	3.55	163.0408	<i>p</i> -Coumaric acid	3.63	1000	965	965	x	x	C ₉ H ₈ O ₃	–4.3	–0.70	3.6
7	3.76	193.0513	Ferulic acid	3.80	998	986	986	x	x	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	–3.6	–0.70	1.4
8	4.68	301.0349	Quercetin	4.76	999	979	979	x	x	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1.5	0.44	6.3
9	5.76	253.0511	Chrysin	5.92	952	905	905	x	x	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	–2.0	–0.50	261.4

^a Retention time of the compound in the sample.^b Retention time of the compound in the spectral library.^c Comparison of the theoretical with the measured exact mass (search tolerance of 3 mDa).^d Comparison of the theoretical with the measured isotope pattern (sigma value × 10³).**Table 3**

Identified compounds in the derived-plant concentrate samples in the negative polarity.

Identified compounds	Borage			Cabbage-broccoli			Garlic			Lemon			Onion		
	Purity'	MS	MS/MS	Purity'	MS	MS/MS	Purity'	MS	MS/MS	Purity'	MS	MS/MS	Purity'	MS	MS/MS
Caffeic acid	997	x	x				983	x	x						
Chrysin										916	x	x			
Dihydroxycaffeic acid	985	x	x												
Ferulic acid							959	x	x						
Hesperidin										987	x	x			
Naringenin										999	x				
Quercetin	938	x	x	974	x		938	x	x	999	x		999	x	x
Sinapic acid				915	x	x									
4-Hydroxybenzoic acid	996	x	x												

short analysis time (9.5 min), resolution, sensitivity and peak shape are acceptable, and the identification of compounds using the library search is effective. The matrix is not simple and many peaks were present. Library search was performed against the created ESI-Qq-TOF library, combining the search of retention time, MS and MS/MS spectra and 9 phenolic compounds were identified. Fig. 2 shows the base peak chromatogram (BPC) of the methanolic extract of propolis as well as the extracted ion chromatograms (EIC) of the identified compounds: (1) gallic acid, (2) protocatechuic acid, (3) dihydrocaffeic acid, (4) chlorogenic acid, (5) caffeic acid, (6) *p*-coumaric acid, (7) ferulic acid, (8) quercetin and (9) chrysin. The final list of identified compounds in propolis is shown in Table 2. The quality of identification is given by effective scores (see Library development and search parameters section) and all of them were identified by retention time, MS and MS/MS spectra. Even low-abundance compounds such as protocatechuic acid (peak 2), which intensity was smaller than 1×10^4 , could be identified. Some EIC showed more than one peak. In these cases, the combination of accurate mass, retention time and fragment ions is especially helpful for a final corroboration. In addition, the identification of the compounds can be confirmed using their mass accuracy and isotopic pattern information for formula generation (Table 2).

All the compounds identified in this study have been previously reported in several publications about propolis analysis. In fact, in a previous work of our research group (Gómez-Romero et al., 2007) we identified as well quercetin and chrysin from a different propolis sample using capillary electrophoresis–mass spectrometry. Regarding the identification process itself, there is an obvious disadvantage for not using a library: it was a tedious, very time-consuming task due to the analysis of standards under

the same conditions for a final confirmation, the extensive literature review that was accomplished and the manual checking of data. The advantage of the proposed method is the combined automated search of the chromatographic retention time, MS and corresponding MS/MS spectra, which improves the identification of compounds considerably, saves on study time and reduces ambiguities and false positives hits.

In the positive ion mode, it was possible to identify six of the compounds identified in the negative mode with good effective scores (chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, quercetin and chrysin). The intensity of the other three compounds, gallic, protocatechuic and dihydrocaffeic acids, was already very low in the negative ion mode, so that in the positive one were not even detected.

Concerning the other derived-plant concentrates, as it has been previously commented the number of identified compounds is very small. Table 3 shows the summary of the identified compounds in these samples. As it can be seen, quercetin is present in all the samples analysed. Some peaks were identified by RT and MS only due to acquisition in AutoMS(n) with one precursor ion (i.e. when coeluting several compounds, the acquisition of MS/MS spectra of every single one was not attainable being only possible to obtain fragments from the most intense peaks). This issue could be covered developing a different MS acquisition method with more precursor ions. The identified compounds were as well confirmed by formula generation.

4. Conclusion

A method for the automated and robust identification of phenolic compounds based on library search has been developed. Re-

versed-phase chromatography using 9.5 min acetonitrile–water gradient was applied for the analysis of an initial set of 39 common phenolic compounds. MS measurements were performed using an ESI-qQ-TOF mass spectrometer in both ESI positive and negative mode. Spectra had to fulfil several requirements to be added to the library and were stored with all significant properties.

Real samples were analysed using the same conditions as the reference spectra. Due to the automated MS to MS/MS switching during acquisition, data of both precursor and product ions are obtained from a single run. At the end of the acquisition, we performed the automated library search, generating a list with the identified compounds from the sample.

The proposed LC/MS method is fast, sensitive, enabling the characterisation of even low-abundance phenolic compounds, and provides mass accuracy and true isotopic pattern for both precursor and product ions. Furthermore, combining the search of retention time, MS and MS/MS spectra, the method improves the identification of compounds considerably and reduces ambiguities and false positive hits.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Grant AP-2005-2985 and Project AGL2008-05-108-C03-03/ALI from Ministerio de Educación y Ciencia, Bruker Daltonik GmbH and Verbionat S.A.

References

- Alcalá, J., Segura, A.J., Romero, A., Díez, A., Palacios, E., Ruiz, F., et al. (2005). Antioxidant properties of diets supplemented with two natural products, propolis and Verbivital[®]. In XXXIII congress of the Spanish society of physiological sciences (P8-2).
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333.
- Careri, M., Bianchi, F., & Corradini, C. (2002). Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis. *Journal of Chromatography A*, 970(1–2), 3–64.
- Careri, M., Mangia, A., & Musci, M. (1998). Overview of the applications of liquid chromatography–mass spectrometry interfacing systems in food analysis: Naturally occurring substances in food. *Journal of Chromatography A*, 794(1–2), 263–297.
- Chernushevich, I. V., Lobota, A. V., & Thomson, B. A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 36(8), 849–865.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1–15.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707–715.
- Ferrer, I., Fernández-Alba, A., Zweigenbaum, J. A., & Thurman, M. (2005). Exact-mass library for pesticides using a molecular-feature database. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(24), 3659–3668.
- Fredenhagen, A., Derrien, C., & Gassmann, E. (2005). An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different application patterns for [M+H]⁺ and [M+Na]⁺ ions. *Journal of Natural Products*, 68(3), 385–391.
- Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Moreno-Torres, R., García-Salas, P., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2007). Antioxidant compounds of propolis determined by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Journal of Separation Sciences*, 30(4), 595–603.
- Hofstadler, S. A., Drader, J. J., & Schink, A. (2006). Selective ion filtering by digital thresholding: A method to unwind complex ESI-mass spectra and eliminate signals from low molecular weight chemical noise. *Analytical Chemistry*, 78(2), 372–378.
- Hughes, J. R., Croley, R. T., Metcalfe, D. C., & March, E. R. (2001). A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International Journal of Mass Spectrometry*, 210–211, 371–385.
- Kondratyuk, T. P., & Pezzuto, J. M. (2004). Natural product polyphenols of relevance to human health. *Pharmaceutical Biology*, 42(Suppl.), 46–63.
- Lee, J. S., Kim, D. H., Liu, K. H., Oh, T. K., & Lee, C. H. (2005). Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(23), 3539–3548.
- Lin, L. Z., & Harnly, J. M. (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1084–1096.
- Ma, Y. L., Li, Q. M., Van den Heuvel, H., & Caléis, M. (1997). Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357–1364.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Miketova, P., Schram, K. H., Whitney, J., Li, M., Huang, R., Kerns, E., et al. (2000). Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(7), 860–869.
- Moco, S., Bino, R. J., Vorst, O., Verhoeven, H. A., de Groot, J., van Beek, T. A., et al. (2006). A liquid chromatography–mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiology*, 141(4), 1205–1218.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523–1542.
- Pérez-Magariño, S., Revilla, I., González-SanJosé, M. L., & Beltrán, S. (1999). Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *Journal of Chromatography A*, 847(1–2), 75–81.
- Raether, O., Schubert, M., Stoermer, C., Suetering, J., Pelzing, M. (2004). Technique to increase mass resolution and accuracy for API-TOF instruments without extension of the effective flight path. In Proceedings of the 52nd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics (ThPG112).
- Stöggli, W. M., Huck, C. W., & Bonn, G. K. (2004). Structural elucidation of catechin and epicatechin in sorrel leaf extracts using liquid-chromatography, coupled to diode array-fluorescence and mass spectrometric detection. *Journal of Separation Science*, 27(7–8), 524–528.
- Sun, J., Liang, F., Bin, Y., Li, P., & Duan, C. (2007). Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. *Molecules*, 12(3), 679–693.
- Wolfender, J. L., Waridel, P., Nodjoko, K., Hobby, K. R., Major, H. J., & Hostettmann, K. (2008). Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis*, 28(10), 895–906.
- Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., & Liu, S. (2004). Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1047(2), 213–220.
- Xing, J., Xie, C., & Lou, H. (2007). Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in natural products bioanalysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(2), 368–378.
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberán, F. A., Datta, N., Singanusong, R., et al. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59(3), 113–122.

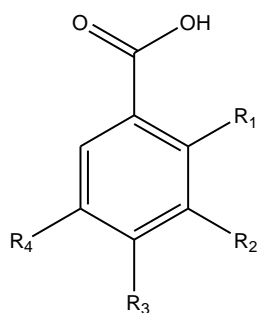
ANEXO BLOQUE IV

ESTUDIO DE LAS FRAGMENTACIONES OBTENIDAS MEDIANTE (+)ESI-Qq-TOF DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS INCLUIDOS EN LA BASE DE DATOS

1. Structures and purchase sources for the phenolic standards included in the library

❖ *Phenolic acids and derivatives*

• Hydroxybenzoic acids

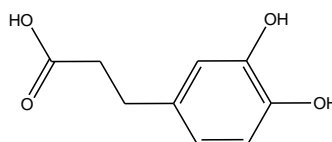


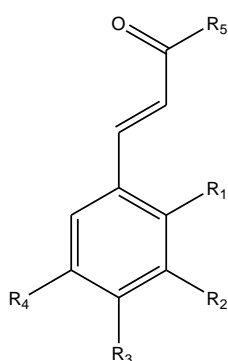
Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Source
Gallic acid	H	OH	OH	OH	Aldrich
Gentisic acid	OH	H	H	OH	Sigma
Protocatechuic acid	H	OH	OH	H	Sigma
Salicylic acid	OH	H	H	H	Sigma
Syringic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Fluka
Vanillic acid	H	OCH ₃	OH	H	Sigma
2,4-Dihydroxybenzoic acid	OH	H	OH	H	Fluka
3-Methoxybenzoic acid	H	OCH ₃	H	H	Fluka
4-Hydroxybenzoic acid	H	H	OH	H	Fluka

• *Hydroxycinnamic acids*

Dihydrocaffeic acid

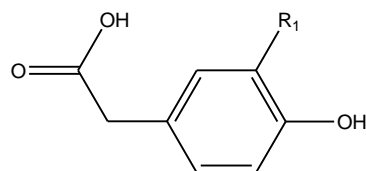
Source: Sigma





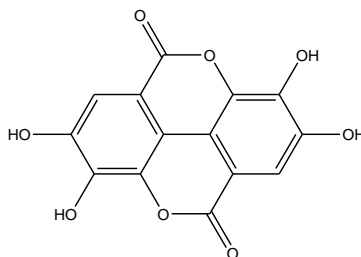
Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Source
Caffeic acid	H	OH	OH	H	OH	Sigma
Chlorogenic acid	H	OH	OH	H	Quinic acid	Sigma
Ferulic acid	H	OCH ₃	OH	H	OH	Sigma
m-Coumaric acid	H	OH	H	H	OH	Aldrich
o-Coumaric acid	OH	H	H	H	OH	Sigma
p-Coumaric acid	H	H	OH	H	OH	Sigma
Sinapic acid	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	Sigma
<i>trans</i> -Cinnamic acid	H	H	H	H	OH	Aldrich

❖ **Other phenolic compounds**

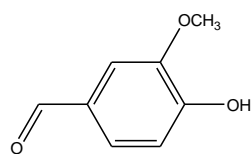


Compound	R ₁	Source
Homovanillic acid	OCH ₃	Fluka
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	OH	Sigma
4-Hydroxyphenylacetic acid	H	Aldrich

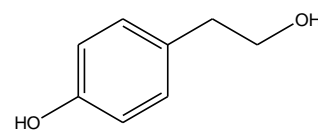
Ellagic acid
Source: Sigma



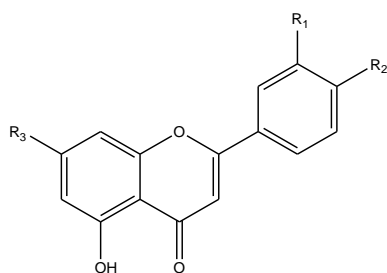
Vanillin
Source: Sigma



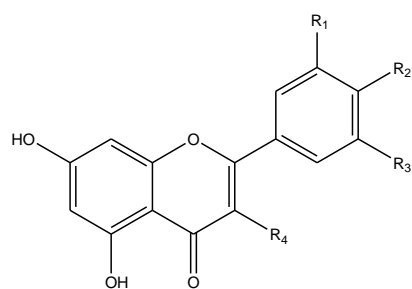
Tyrosol
Source: Fluka



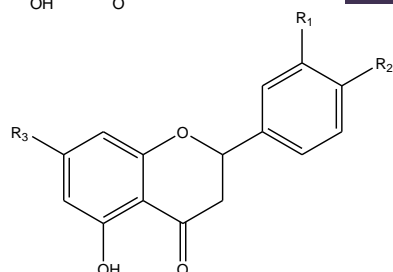
❖ **Flavonoids and derivatives**



Flavone	R ₁	R ₂	R ₃	Source
Apigenin	H	OH	OH	Extrasynthese
Chrysin	H	H	OH	Aldrich
Luteolin	OH	OH	OH	Extrasynthese
Luteolin 7-o-glucoside	OH	OH	Glucoside	Extrasynthese



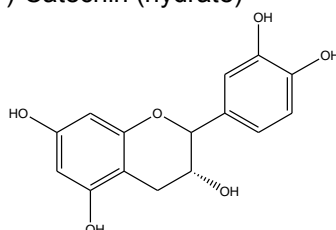
Flavonol	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Source
Kaempferide	H	OCH ₃	H	OH	Extrasynthese
Myricetin	OH	OH	OH	OH	Extrasynthese
Quercetin (dihydrate)	OH	OH	H	OH	Sigma
Rutin	OH	OH	H	Rutinoside	Sigma



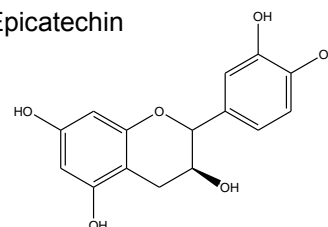
Flavanone	R ₁	R ₂	R ₃	Source
Hesperidin	OH	OCH ₃	Rutinoside	Extrasynthese
Isosakuranetin	H	OCH ₃	OH	Extrasynthese
Naringenin	H	OH	OH	Sigma

- **Flavan-3-ols:** (+)-Catechin (hydrate)

Source: Sigma

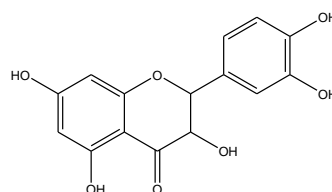


- (-)-Epicatechin



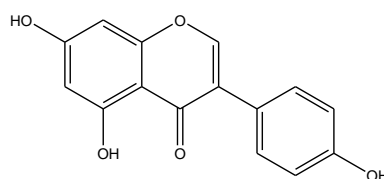
- **Flavanolol:** (+)-Taxifolin

Source: Sigma



- **Isoflavone:** Genistein

Source: Sigma



2. Fragmentation behaviour of phenolic standards

The quality of an MS/MS product-ion mass spectrum can be defined using the number of reasonably intense characteristic fragment ions. The larger number of characteristic fragment ions, the higher the certainty of identifying a compound based on its MS/MS spectrum.

The ionization method used yielded protonated and deprotonated molecules in positive and negative ion modes respectively for all the phenolic compounds studied (except for tyrosol, which did not produce $[M+H]^+$ in the positive ION mode). Therefore, these protonated molecules were the preferred precursor ions for the MS/MS analysis. However, for some phenolic acids, ions resulting from losses of small molecules, such as H_2O or CO_2 , were more prominent and were also taken as precursor ions. On the other hand, the relative abundance of the fragments is highly associated with the applied COEY. If it is low the main fragment in the MS/MS spectra produced is the protonated molecule, i.e. it can not be totally fragmented, while the fragments are negligible. By increasing the COEY a complete fragmentation of the protonated molecule is obtained.

In the present annex only the fragmentation of the phenolic compounds included in the library will be discussed.

2.1. Hydroxybenzoic acids and derivatives

In the positive ion mode, the fragmentation behaviour of the protonated molecule included dehydration (hydroxyl groups led to abundant peaks corresponding to the neutral loss of water m/z 18) and in most cases losses of CO and/or CO_2 . Dehydrated fragments ions were more prominent for gentisic and salicylic acids than protonated ions in the MS spectrum. Methoxylated acids also showed the loss of CH_3 in this mode providing the $[M+H-59]^+$ fragment ion.

2.2. Cinnamic acids and derivatives

Dehydration from the quasi molecular ion $[M+H]^+$ is the typical fragmentation reaction for cinnamic acids in the positive ion mode. In fact, the $[M+H-18]^+$ fragment ion was more prominent in the MS spectrum than the $[M+H]^+$ ion for all the cinnamic acids added to the library. Moreover, for most of them the complete fragmentation of the $[M+H]^+$ precursor ion occurred and it totally disappeared in the MS/MS spectra. Losses of CH_3 (if the acid is methoxylated), CO_2 and, most of all, CO also happened. The $[M+H-46]^+$ cation radical (loss of CO and H_2O) was significant in caffeic, ferulic, *p*-coumaric and *trans*-cinnamic acids.

The three isomers, *o*-coumaric, *m*-coumaric, and *p*-coumaric acids, which differ by the position of the hydroxy substitution of the phenyl group, had almost identical fragmentation patterns in the negative ion mode. Nevertheless, in the positive ion mode *o*-

coumaric acid fragmented differently; the loss of CO₂ was significant ([M+H-18-44]⁺) in that isomer whilst in the other two the loss of CO was preferred ([M+H-18-28]⁺).

2.3. Other phenolic compounds

Hydroxyphenylacetic acids fragmented alike hydroxybenzoic acids and cinnamic acids; a common loss in the positive ion was H₂O. Ellagic acid showed many fragment ions, such as [M+H-H₂O]⁺ or [M+H-CO]⁺, with subsequent losses of CO being [M+H-H₂O-CO]⁺ and [M+H-H₂O-3CO]⁺ the fragment ions with the highest relative intensity. A sixfold loss of 28 u could be observed in the MS/MS spectrum in the sequence: [M+H-H₂O]⁺ *m/z* 285 → 257 → 229 → 201 → 173 → 145 → 117. In the negative ion mode vanillin, exhibited the loss of CH₃ but it could not be seen in the positive ion mode. In the latter, the characteristic fragment ions formed were [M+H-42]⁺ and [M+H-60]⁺. The protonated molecule of tyrosol could not be detected in the positive ion mode and only the dehydrated molecule [M+H-H₂O]⁺ (*m/z* 121) was observed.

2.4. Flavonoids and flavonoid glycosides

Flavonoids are formed by a series of condensation reactions between hydroxycinnamic acid (B-ring and carbon atoms 2, 3 and 4 of the C-ring) and malonyl residues (A-ring). The three-carbon bridge between the phenyl rings is commonly cyclized to form the third ring (C-ring)¹⁶¹.

In the structural elucidation of flavonoids, positive ion CID spectra are most frequently used, whereas negative ion CID spectra are often considered to be more difficult to interpret. According to Tsimogianis *et al.*¹⁶², in the positive ion mode each flavonoid subgroup exhibits a characteristic fragmentation behaviour whilst the negative ionization mode does not produce characteristic fragments for each subclass. However, the negative ion mode is more sensitive in flavonoids analysis, and the fragmentation behaviour provides additional information^{163,164}.

¹⁶¹ Cuyckens, F., Claeys, M., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*, J. Mass Spectrom. 2004, 39, 1-15.

¹⁶² Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS, *Molecules* 2007, 12, 593-606.

¹⁶³ Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., Quetin-Leclercq, J., *Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2001, 12, 707-715.

Fragment ions can be designated according to the nomenclature proposed by Ma and co-workers^{165, 166}. The $i,jA^{+/-}$ and $i,jB^{+/-}$ represent product ions containing intact A and B-rings, respectively, in which subscripts i and j indicate the C-ring bonds that have been broken. The major routes of fragmentation resulting in A and B ions require cleavage of the C-C bonds by retro Diels-Alder (RDA) reactions at positions 1/2, 1/3, 1/4 or 0/4 of the C-ring (**figure A.1**). Losses of small neutral molecules, such as H₂O (18 u), CO (28 u), CO₂ (44 u), C₂H₂O (42 u) and the successive loss of these molecules, may also be prominent.

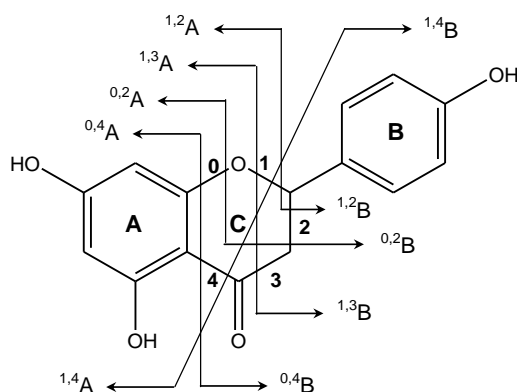


Figure A.1. Nomenclature adopted for different retrocyclization cleavages observed (illustrated on naringenin)

Three **flavone** aglycones have been included in the library at both initial and higher COEY: apigenin, chrysin and luteolin, whose fragmentation pathways in the positive ion mode have already been studied for several authors^{167,162,165}. The CID MS/MS spectra of the protonated molecules $[M+H]^+$ yielded the $1,3A^+$, $1,3B^+$, $0,4B^+$ and $0,4B^+-H_2O$ fragments, characteristic of the C-ring cleavage, being $1,3A^+$ (m/z 153) the most abundant ion. $0,2B^+$ was also detected in the mass spectra of luteolin and apigenin as a minor fragment, with m/z 137 and 121, respectively, but not in the case of chrysin, which lacks the B-ring hydroxy substitution¹⁶².

For the **flavonols** quercetin and myricetin, $[M+H]^+$ product ions dehydrated, followed by three sequential losses of CO ($[M+H-H_2O-3CO]^+$ at m/z 201 for quercetin and 217 for myricetin). Furthermore the C-ring degraded by cleavage of bonds 0/2 and 1/3 and produced

¹⁶⁴ Hughes, J.R., Croley, R.T., Metcalfe, D.C., March, E.R., *A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids*, Int. J. Mass Spectrom. 2001, 210-21,; 371-378.

¹⁶⁵ Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H., Caléis, M., *Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1997, 11, 1357-1364.

¹⁶⁶ Ma, Y.L., Van den Heuvel, H., Claeys, M., *Characterization of 3-methoxyflavones using fast-atom bombardment and collision-induced dissociation tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 1999, 13, 1932-1942.

¹⁶⁷ Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., Liu, S., *Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 2004, 1047, 213-220.

the respective RDA fragments of the protonated molecule¹⁶². In particular, the C-ring fission of myricetin resulted in $^{0,2}B^+$ and $^{1,3}A^+$ fragments that possess equal m/z 153 peaks, as well as $^{0,2}A^+$ and $^{1,3}B^+-2H$ ones with m/z 165. Quercetin exhibited $^{1,3}A^+$ (m/z 153) and $^{0,2}B^+$ (m/z 137) ions as well. Due to the presence of a methoxy group in the B ring, a different fragmentation pattern from that of the other flavonols was found for kaempferide¹⁶³. The loss of the radical CH_3 was observed, followed by consecutive CO losses. Other fragment ions were also recorded from the RDA fragmentation ($^{1,3}A^+$, $^{1,3}A^+-H_2O$ and $^{0,2}A^+$).

Dihydroflavonols (or flavanonols) are isomers of flavanones. The MS/MS spectrum in the positive ion mode of taxifolin (dihydroquercetin) contained more structural information than in the negative. $[M+H]^+$ exhibited an initial dehydration to $[M+H-H_2O]^+$ and sequential losses of two carbonyl groups to form $[M+H-H_2O-CO]^+$ and $[M+H-H_2O-2CO]^+$ at m/z 231, which was consistent with a previous report¹⁶². Additional major fragments were $^{0,2}A^+$, $^{1,3}A^+$, $^{0,2}A^+-H_2O$ and $^{0,2}A^+-CO_2$ at m/z 167, 153, 149, 123, respectively.

The protonated molecules $[M+H]^+$ of two **flavanones**, naringenin and isosakuranetin (4'-methylnaringenin), produced $^{1,3}A^+$ as the most abundant ion of MS/MS spectra¹⁶². Together with $^{1,3}A^+$, corresponding $^{1,4}B^+-2H$ and $^{1,4}B^+-2H-CO$ were observed at m/z 147 and m/z 119 in the case of naringenin and at m/z 161 and m/z 133 in the case of isosakuranetin.

Flavan-3-ols isomers, (+)-catechin and (-)-epicatechin were also studied. A detailed MS/MS study on the positive ion mode of flavan-3-ols has been published¹⁶⁸. The series of A and B fragment ions ($^{1,3}A^+$, $^{1,2}B^+$, and $^{1,4}B^+-2H$) were observed in the spectra of both compounds. Ion at m/z 147, which may result from a water loss from the $^{1,4}B^+-2H$ ion (m/z 165), was also discernible in the product ion spectra.

In the positive ion mode, the **isoflavone** genistein lost consecutively two CO molecules from the C-ring, leading to the overall loss of 56 u, which is a common feature of isoflavones¹⁶⁹. Further losses of H_2O and CO were also detected. With respect to the intensity of the base peak $^{1,3}A^+$ at m/z 153, the intensities of those ions were: 42% for $[M+H-2CO]^+$ and 25% for $[M+H-3CO-H_2O]^+$.

Glycosylated flavonoids (rutin, hesperidin and luteolin 7-o-glucoside) provided solely parent and aglycone ions in both the positive and the negative ion mode. Therefore

¹⁶⁸ Cren-Olivé, C., Déprez, S., Lebrun, S., Coddeville, B., Rolando, C., *Characterization of methylation site of monomethylflavan-3-ols by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2000, 14, 2312-2319.

¹⁶⁹ Kuhn, F., Oehme, M., Romero, F., Abou-Mansour, E., Tabacchi, R., *Differentiation of isomeric flavone/isoflavone aglycones by MS² ion trap mass spectrometry and a double neutral loss of CO*, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003, 17, 1941-1949.

little structural information with regard to the aglycone part could be obtained from the MS/MS spectra of the glycosides. The MS spectra in the positive ion mode of the flavonoid o-diglycosides, rutin and hesperidin, showed the protonated $[M+H]^+$ molecule of the glycoside as the base peak as well as two more ions formed by losing the corresponding glycosides (e.g. rutin MS spectrum showed $[M+H\text{-rhamnose}]^+$ at m/z 465 and the protonated aglycone $[M+H\text{-rutinose}]^+$ at m/z 303). The loss of only one of the glycosides, however, was not detected in the MS/MS spectra.

Table A.1. Retention times and spectral information in the positive ion mode of the studied phenolic compounds

Compound	Formula	RT, min	Positive mode			
			$[M+H]^+$	Higher m/z in MS	CID in MS (higher ion)	MS/MS ions (%)
<i>Benzoic acids and derivatives</i>						
Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	1.63	171.0287 (100)	No	153.0181 (35) 127.0387 (35)	153.0188 (69) 127.0416 (44) 125.0236 (65) 109.0289 (100) 107.0106 (81) 81.0326 (70)
Gentisic acid	C ₇ H ₆ O ₄	3.02	155.0332 (48)	201.0549 (14) 361.9755 (8)	137.0226 (100)	137.0226 (100) 109.0278 (10) 81.0325 (19)
Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	2.43	155.0331 (100)	177.0138 (4)	137.0233 (22); 111.0436 (32); 93.0331 (9)	137.0240 (46) 109.0276 (14) 111.0436 (100) 93.0331 (66)
Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	3.96	139.0388 (36)	329.9852 (23)	121.0289 (100)	121.0291 (100)
Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	3.27	199.0610 (100)	221.0419 (30) 239.0535 (6)	181.0498 (18) 155.0701 (44) 140.0567 (22)	140.0470 (100) 123.0441 (10) 95.0491 (26)
Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	3.14	169.0499 (100)	191.0316 (5)	151.0389 (14) 125.0599 (31)	151.0405 (36) 125.0597 (16) 111.0444 (100) 110.0364 (22) 93.0336 (76)
2,4-Dihydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄	3.26	155.0338 (100)	169.1186 (6) 201.0548 (5) 361.9757 (5)	137.0233 (74)	137.0236 (100) 81.0328 (6)
3-Methoxy benzoic acid	C ₈ H ₈ O ₃	4.32	153.0552 (100)	175.0359 (3)	135.0446 (24) 109.0656 (87) 94.0414 (11)	135.0461 (30) 109.0654 (100) 105.0450 (19) 94.0416 (97)
4-Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	2.94	139.0395 (100)	201.0559 (4)	121.0291 (28) 95.0491 (26)	121.0298 (88) 105.0448 (17) 95.0491 (100) 77.0374 (11)
<i>Hidroxicinnamic acids and derivatives</i>						
Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	3.24	181.0495 (27)	201.0162 (5)	163.0394 (100) 135.0440 (3)	163.0393 (100) 145.0288 (32)

						135.0439 (75) 117.0336 (23) 89.0383 (13)
Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.07	355.1016 (59)	377.0831 (7); 731.1795 (4)	163.0392 (100)	163.0389 (100) 145.0292 (4)
Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	3.80	195.0652 (42)	217.0461 (9)	177.0560 (100) 145.0281 (7)	177.0548 (64) 149.0598 (36) 145.0286 (100) 117.0337 (39) 89.0382 (9)
<i>m</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	3.88	165.0545 (25)	187.0353 (4)	147.0447 (100) 119.0492 (13) 91.0540 (4)	147.0439 (88) 119.0491 (100) 91.0541 (64)
<i>o</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	4.07	165.0553 (40)	187.0365 (20) 205.0478 (6)	147.0449 (100) 123.0445 (26) 103.0544 (16)	147.0446 (33) 123.0443 (65) 103.0544 (100) 95.0491 (30) 91.0545 (50)
<i>p</i> -Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	3.63	165.0541 (30)	187.0353 (7) 205.0478 (2)	147.0447 (100) 119.0490 (8) 91.0541 (2)	147.0437 (100) 119.0494 (90) 91.0540 (31)
Sinapic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	3.85	225.0760 (29)	247.0581 (17)	207.0660 (100) 175.0389 (7)	207.0659 (43) 192.0420 (40) 175.0391 (100) 147.0439 (81) 119.0491 (68) 91.0542 (24)
<i>trans</i> -Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	4.69	149.0582 (18)	No	131.0487 (100) 103.0539 (29)	131.0490 (65) 103.0540 (100) 95.0486 (3)
Dihydrocaffeic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	3.00	183.0644 (42)	203.0302 (29) 205.0461 (15) 345.1010 (8)	165.0543 (39) 123.0444 (100)	163.0408 (21) 151.0388 (22) 139.0401 (38) 135.0445 (56) 123.0446 (100) 111.0441 (21) 107.0494 (56) 79.0531 (14)
<i>Other phenolic compounds</i>						
Homovanillic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	3.22	183.0648 (43)	205.0468 (25)	137.0595 (100)	137.0600 (100) 122.0369 (6)
DOPAC	C ₈ H ₈ O ₄	2.34	169.0498 (83)	189.0157 (27) 191.0312 (14) 289.0722 (6)	123.0444 (100) 95.0485 (3)	125.0235 (27) 123.0444 (100) 111.0443 (13) 97.0294 (12) 95.0497 (11)
4-Hydroxy phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	2.92	153.0549 (100)	171.0651 (14) 175.0363 (8)	107.0494 (79)	107.0493 (100)
Ellagic acid	C ₁₄ H ₆ O ₈	3.80	300.0136 (100)	324.9937 (3)	No	285.0065 (17) 275.0218 (51) 257.01008 (99) 247.0256 (65) 229.0152 (75) 219.0307 (17)

						201.0199 (100) 191.0349 (21) 173.0240 (45) 163.0393 (14) 145.0291 (23) 117.0331 (11)
Vanillin	C ₈ H ₈ O ₃	3.49	153.0552 (100)	175.0359 (4)	125.0600 (31) 111.0444 (8) 93.0334 (10)	125.0599 (22) 111.0445 (86) 93.0336 (100) 65.0376 (11)
Tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	2.73	No	161.0577 (3)	121.0653 (100) 103.0542 (9) 93.0697 (5)	No
<i>Flavones and glycosides</i>						
Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5.14	271.0601 (100)	No	No	171.0285 (16) 153.0180 (100) 145.0274 (21) 119.0484 (51) 91.0539 (21)
Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	5.92	255.0648 (100)	277.0455 (7)	No	171.0315 (13) 153.0187 (100) 147.0436 (14) 129.0324 (19) 105.0347 (16) 103.0542 (34)
Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	4.76	287.0554 (100)	309.0379 (3)	No	171.0305 (13) 161.0235 (13) 153.0181 (100) 135.0442 (41)
Luteolin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	3.81	449.1064 (100)	471.0888 (1)	287.0542 (4)	287.0551 (100)
<i>Flavonols and glycosides</i>						
Kaempferide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	6.06	301.0709 (100)	323.0515 (6)	No	286.0489 (26) 258.0541 (80) 230.0575 (100) 153.0178 (75) 139.0386 (19) 135.0444 (29)
Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	4.28	319.0438 (100)	341.0242 (3)	No	273.0411 (10) 245.0457 (22) 217.0499 (29) 165.0181 (14) 153.0180 (100) 137.0229 (13) 111.0088 (13)
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	4.76	303.0496 (100)	325.0331 (4)	No	229.0500 (54) 201.0536 (32) 153.0185 (100) 137.0242 (60)
Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	3.73	611.1606 (100)	633.1408 (100)	465.1017 (4) 303.0496 (4)	303.0502 (100)
<i>Flavanones and glycosides</i>						
Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	3.94	611.1956 (199)	633.1819 (16)	449.1428 (26); 303.0849 (15)	303.0854 (100)

BLOQUE IV. Anexo. Fragmentaciones mediante (+)ESI-Qq-TOF

Isosakuranetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	5.94	287.0907 (100)	309.0712 (8)	No	161.0592 (62) 151.0180 (100) 133.0643 (6)
Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	5.11	273.0757 (100)	295.0562 (2)	No	153.0182 (100) 147.0437 (57) 119.0493 (5)
<i>Other flavonoids (Flavan-3-ols, isoflavone, flavanolol)</i>						
(+)-Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	2.99	291.0864 (100)	579.1493 (4)	139.0399 (15) 123.0437 (7)	207.0650 (17) 165.0547 (8) 147.0437 (20) 139.0389 (100) 123.0440 (49)
(-)-Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	3.26	291.0864 (100)	No	139.0392 (10) 123.0447 (5)	207.0649 (18) 165.0550 (8) 147.0441 (19) 139.0394 (100) 123.0444 (51)
Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	5.09	271.0602 (100)	293.0415 (12)	No	243.0664 (22) 215.0705 (42) 197.0602 (23) 169.0648 (25) 153.0183 (100) 91.0541 (63)
(+)-Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	3.85	305.0656 (100)	327.0460 (6)	287.0550 (8) 259.0598 (6)	259.0601 (40) 231.0651 (100) 167.0338 (19) 153.0180 (94) 149.0231 (81) 123.0440 (61)

**CONCLUSIONES FINALES/
FINAL CONCLUSIONS**

CONCLUSIONES FINALES

1. Se han desarrollado una serie de MIPs para la extracción selectiva en fase sólida (limpieza y enriquecimiento) de ciertos compuestos fenólicos presentes en matrices complejas. Los polímeros se han sintetizado utilizando hidroxitirosol, tirosol, catecol y los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico como moléculas molde y llevando a cabo dos tipos de polimerización radicalaria no covalente: en disolución y por precipitación. Para poder demostrar el efecto impronta en los MIPs, los correspondientes polímeros de control no impresos han sido también sintetizados utilizando las mismas condiciones pero en ausencia de molécula molde.
2. El MIP sintetizado mediante polimerización en disolución, utilizando hidroxitirosol como molécula molde, 4-vinilpiridina y etilenglicol dimetacrilato como monómeros funcional y entrecruzador, respectivamente, y acetonitrilo como porógeno, ha sido evaluado como fase adsorbente para la extracción de hidroxitirosol. En primer lugar, se han caracterizado los sitios de unión del MIP mediante estudios de distribución de afinidad llevando a cabo experimentos en “*batch*” y ajustando matemáticamente los datos obtenidos al modelo de isothermas de adsorción de Freundlich. A partir de los datos del ajuste, se han calculado las constantes de afinidad y la densidad de los sitios de unión, siendo los valores de ambos parámetros mayores para el MIP que para el NIP, demostrándose así el efecto impronta. En segundo lugar, se ha estudiado la selectividad del MIP y se ha puesto en evidencia la importancia de los disolventes usados en las distintas etapas del proceso de SPE a la hora de conseguir una extracción selectiva. El MIP ha mostrado gran capacidad de retención específica para el hidroxitirosol cuando se han usado acetonitrilo o una mezcla de acetonitrilo/cloroformo (1:3, v/v) como disolventes en la carga y el lavado. Las interacciones disolvente-analito-adsorbente y la existencia de sitios de unión específicos para el hidroxitirosol en el MIP se han explicado utilizando los parámetros de solubilidad de Hansen. Finalmente, la capacidad de extracción del MIP se ha comparado con la de una fase Diol comercial, siendo capaz de retener mayores

cantidades de hidroxitirosol y de tirosol de la muestra de aceite de oliva analizada. De este modo, se ha demostrado que el MIP sintetizado puede usarse eficazmente en el tratamiento de muestras complejas, ya que es de bajo coste, fácil preparación, estable térmica- y mecánicamente y presenta actividad y selectividad después de numerosos usos.

3. El contenido en compuestos fenólicos en los productos procedentes de la colmena depende del clima y del origen geográfico y floral de la zona donde las abejas realizan la recolección. Se ha hecho una revisión bibliográfica exhaustiva acerca de las técnicas analíticas empleadas para llevar a cabo el análisis de compuestos fenólicos en propóleo, lo cual ha permitido identificar la metodología más relevante para conseguir dicho objetivo: antes del año 2006, la MS nunca se había usado como detector acoplado a la CE.
4. Se ha puesto de manifiesto la potencialidad del acoplamiento CZE-ESI-MS para llevar a cabo la identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios que contiene una muestra de propóleo. En primer lugar, se han estudiado pormenorizadamente tanto de los parámetros que afectan a la separación electroforética, como de los que afectan a la intensidad de la señal en el espectrómetro de masas con analizador IT. Mediante el método optimizado, se han identificado tentativamente doce flavonoides en el extracto de propóleo, obtenido utilizando etanol al 70% como disolvente. Se ha podido corroborar la identificación de estos compuestos mediante el uso de otro espectrómetro de masas con analizador TOF que proporciona datos de masa exacta y de distribución isotópica, a partir de los cuales genera la fórmula molecular de los compuestos detectados. Los flavonoides identificados poseen gran actividad biológica y se consideran responsables de parte de las propiedades beneficiosas del propóleo. Además, los compuestos fenólicos que contiene un propóleo se han utilizado como posibles marcadores de su origen floral y geográfico. Así, la muestra de propóleo analizada en este trabajo contenía, entre otros, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y crisina, compuestos típicos de los propóleos europeos procedentes mayoritariamente de las resinas de los álamos.
5. La variedad cultivada, la época de recolección o las condiciones de almacenamiento, entre otros factores, afectan al contenido en compuestos antioxidantes en tomate, y son muchas las metodologías empleadas para la determinación de estos compuestos en el fruto del tomate. Se ha revisado exhaustivamente la bibliografía publicada acerca del análisis de antioxidantes (vitaminas, carotenoides, compuestos fenólicos) en dicho alimento. Este estudio ayudó a clarificar que compuestos no han sido estudiados en

profundidad, que metodología sería más útil a la hora de caracterizarlos, y, en definitiva, que objetivos debían ser planteados. Teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de cada metodología y el instrumental disponible en nuestro laboratorio, se ha desarrollado y aplicado un método cromatográfico para conseguir los objetivos fijados.

6. Actualmente, las propiedades beneficiosas del consumo de tomate se atribuyen al efecto sinérgico de varios de sus compuestos, de ahí la importancia de estudiar su perfil completo. Por ello, se ha realizado el análisis del extracto metanólico de tres variedades de tomate (Daniela, Rambo, Raf) cultivadas en la provincia de Almería. Para poder identificar todos los metabolitos presentes en el extracto, con propiedades tan divergentes, se ha desarrollado un método de HPLC utilizando distintos detectores, DAD y ESI-MS (con dos analizadores de masas diferentes, IT y TOF). La combinación de la información obtenida mediante los distintos detectores con los datos bibliográficos, las bases de datos existentes y los patrones disponibles en el laboratorio, ha permitido la identificación tentativa de 135 metabolitos pertenecientes a 6 familias de compuestos diferentes (aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, compuestos fenólicos, triterpenoides y ácidos grasos). De acuerdo con la revisión bibliográfica realizada, 21 de estos metabolitos (la mayoría ácidos grasos) no se han descrito antes en el fruto del tomate. El estudio del perfil metabólico completo de cualquier matriz vegetal (fruto completo, semillas, hojas) ayudará a entender los cambios fisiológicos que ocurren en ella durante su desarrollo.
7. De todos los metabolitos hallados en el extracto de las tres variedades de tomate, aquellos que estaban presentes en mayor concentración han sido los compuestos fenólicos. En la variedad Daniela se han identificado tentativamente 61 compuestos fenólicos, incluyendo alcoholes fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, benzoicos, fenilacéticos y flavonoides, la mayoría de ellos en forma glucosada. El método cromatográfico con (-)ESI-TOF como sistema de detección ha sido validado, y posteriormente se ha empleado en la cuantificación de la fracción fenólica del extracto metanólico; al no existir patrones comerciales de la mayoría de los compuestos identificados, se ha usado un estándar perteneciente a la misma familia. Se ha logrado así hacer una estimación de la abundancia de cada compuesto y cada familia de compuestos en las tres variedades, destacando en todas ellas los ácidos hidroxicinámicos (y entre ellos, el ácido cafeoilquínico con sus distintos isómeros), seguidos de los ácidos fenilacéticos, cuya presencia en tomate ha sido poco descrita en bibliografía. La mayoría de los flavonoides detectados pertenecen a la familia de los

flavonoles (un gran número de ellos derivados de la quercetina). La comparación cuantitativa de las tres variedades analizadas nos permite concluir que la mayoría de los compuestos han sido encontrados en las tres variedades, aunque sus cantidades difieren considerablemente, detectándose los mayores niveles de compuestos fenólicos en la variedad Daniela. El conocimiento acerca del contenido en compuestos fenólicos ayudará a definir más claramente las propiedades de cada variedad y a evaluar su potencial como fuente de antioxidantes fenólicos, pudiendo incluirse estos datos en las tablas españolas de composición de alimentos. Hoy día el consumidor tiende a demandar alimentos con propiedades beneficiosas para la salud, por lo que posee gran importancia la cuantificación de compuestos bioactivos en matrices alimentarias.

8. Se ha puesto a punto un método mediante HPLC-ESI-QqTOF para la identificación automática, rápida y robusta de compuestos fenólicos, facilitando y agilizando así esta etapa crucial del proceso analítico, que puede representar un trabajo manual largo y tedioso. Para ello, se ha construido una base de datos de espectros de masas y masas/masas en polaridad negativa y positiva, que incluye además tiempos de retención, información acerca de los compuestos y los correspondientes parámetros utilizados en la adquisición, relativos a 39 compuestos fenólicos. El potencial del método desarrollado se ha demostrado analizando algunos de los ingredientes de origen vegetal de un complemento alimenticio (propóleo, cebolla, ajo, limón, brócoli-col, borraja), y se han podido identificar con éxito varios compuestos en los extractos estudiados en menos de 10 min de análisis.
9. Se han estudiado los patrones de fragmentación de todos los compuestos fenólicos incluidos en la mencionada base de datos producidos en el Qq-TOF en ambas polaridades. Cada familia exhibe un patrón de fragmentación característico, por lo que el conocimiento en detalle de estas fragmentaciones facilitará la identificación de compuestos que inicialmente no fueron incorporados a la base de datos. Además, el analizador Qq-TOF ha demostrado ser un sistema de detección muy atractivo para la determinación y caracterización de compuestos fenólicos, ya que proporciona exactitud en términos de masa molecular y distribución isotópica tanto en el espectro de masas como en el de masas/masas, facilitando la elucidación estructural.

FINAL CONCLUSIONS

1. A number of molecularly imprinted polymers (MIPs) have been developed for the selective extraction (cleaning and enrichment) of certain phenolic compounds contained in complex matrices. The polymers have been synthesised using hydroxytyrosol, tyrosol, catechol and 3,4-dihydroxyphenylacetic and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acids) as the templates by means of two types of radical non-covalent polymerisation: monolith and precipitation. In order to demonstrate the imprinting effect, the corresponding non-imprinted polymers (NIPs) have been also synthesised in parallel and under identical conditions, but in the absence of the template.
2. The MIP synthesised by monolith polymerisation, using hydroxytyrosol as template, 4-vinylpyridine and ethylene glycol dimethacrylate as functional and crosslinking monomers, respectively, and acetonitrile as porogen, has been evaluated as sorbent for the solid-phase extraction of hydroxytyrosol. First, the binding properties of the MIP have been investigated; batch rebinding studies were carried out in order to evaluate the affinity distribution. The experimental binding data for these studies were modelled with the Freundlich isotherm equation. The parameters given by this model enabled the calculation of the number of binding sites and the weighted average affinity. The values of both parameters were higher for MIP than for NIP, corroborating the imprinting phenomenon. Second, the selectivity of the MIP has been evaluated by means of a MISPE procedure, revealing the importance of the solvents used in the sample loading and washing steps in order to achieve a selective extraction. The MIP showed high specific binding capacity for hydroxytyrosol when acetonitrile or a mixture of acetonitrile/chloroform (1:3, v/v) were used as loading and washing solvents. Hansen solubility parameters were used to clarify the solvent-analyte-sorbent interactions and to assist in the demonstration of the specific recognition sites complementary to the spatial structure of hydroxytyrosol formed. Finally, MIP binding capacity was compared with a commercially available SPE-Diol sorbent material, enabling the extraction of higher amounts of hydroxytyrosol and tyrosol from the analysed olive oil sample. Thus, the

produced MIP (a low-cost, thermally and mechanically stable material which offers high extraction capacity after repeated operations) can be efficiently used in the sample pre-treatment of complex matrices.

3. The content of phenolic compounds in products derived from bees is strongly affected by the floral, geographical origin and climatic characteristic of the collection site. A comprehensive study of the published literature on analytical techniques used in the analysis of phenolic compounds in propolis was made. Data gathered from the study allowed the identification of significant methodologies that could be used to determine phenolics in propolis: before 2006, MS was never coupled to CE to accomplish that aim.
4. The potential of capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry (CZE-ESI-MS) for the identification of the most abundant phenolic compounds contained in a propolis sample has been demonstrated. The parameters affecting the electrophoretic separation and the intensity of the MS signal using an IT mass analyser, were studied in detail. The optimised method allowed the tentative identification of twelve flavonoids in the propolis extract (obtained using 70% ethanol as extraction solvent). The use of a mass spectrometer with a TOF analyser enabled the corroboration of those identifications, since it is able to provide exact mass and true isotopic pattern for molecular formula generation of detected compounds. The identified compounds show biological activity and might be responsible of the beneficial effects of propolis on health. Moreover, phenolic compounds can be used as floral and geographical markers. In this way, the analysed sample contained pinocembrin, pinobanksin 3-acetate and chrysin, typical components of European propolis coming mainly from poplar resins.
5. The antioxidant compounds and their content in tomato are determined by the variety, agronomic, geographical and seasonal factors. Many analytical procedures have been applied to determine these compounds in the tomato fruit. The published literature regarding the analysis of antioxidant compounds in tomato (vitamins, carotenoids, phenolic acids) has been studied in detail with the aim of determining the compounds that have not been properly characterised and the methodology that would be useful to do so, thus defining the goals to be accomplished. After which, taking into account the advantages and drawbacks of each methodology and the instrumentation available in our laboratory, a chromatographic method was developed and applied in order to achieve these established goals.
6. Nowadays, beneficial properties derived from tomato consumption are attributed to the interactions amongst several of its components, making the study of the complete

metabolite profile of great importance. Thus, the comprehensive analysis of the methanol extract of three tomato varieties (Daniela, Rambo, Raf) cultivated in Almería has been carried out. In order to ensure the identification of all the metabolites (with highly divergent properties) in the extract, an HPLC method coupled to multiple detectors, DAD and ESI-MS (with two different mass analysers, IT and TOF) has been developed. Metabolite assignments were made by comparing the information provided by the different detectors of the compounds detected with the tomato compounds reported in literature and the standards available in-house, and searching in the existing public metabolite databases. In this way, 135 compounds belonging to various structural classes (organic acids, amino acids, nucleosides, phenolic compounds, triterpenoids and fatty acids) were tentatively identified, 21 of which (mostly fatty acids) are, to our knowledge, reported for the first time in the tomato fruit. The comprehensive metabolite profiling of any plant-derived matrix (whole fruit, seeds, leaves) can aid in the interpretation of physiological and developmental effects on plant biochemistry.

7. Among the different classes of metabolite found, the most abundant were phenolic compounds. A total of 61 compounds were identified in Daniela cultivar, including phenolic alcohols, hydroxybenzoic, hydroxycinnamic and phenylacetic acids and flavonoids, mainly its glucosides. The chromatographic method, using (-)-ESI-MS as detection system, was validated and employed for the quantitative analysis of the phenolic fraction of the methanol extract; since standards were not commercially available, an external standard of the same phenolic family was used in the quantification. In this way, quantitative estimates in terms of individual compounds and phenolic families were done in. In all the tomato cultivars, hydroxycinnamic acids (and amongst them, caffeoylquinic acid and its isomers) were the main phenolic compounds, followed by phenylacetic acids, whose presence has been scarcely described in the literature. Concerning flavonoids, flavonols was the most abundant family, in special quercetin derivatives. The quantification data allowed the comparison of the three tomato cultivars selected. Most phenolic compounds were detected in all three varieties, although their quantities differed considerably. The highest levels of phenolic compounds were detected in the Daniela cultivar. Knowledge of the phenolic content in tomato will help to assess the properties of each variety more clearly and to define their potential as a source of phenolic antioxidants. These data may be even used in the Spanish food composition tables. Nowadays, consumers ask for foods with beneficial health effects, thereby the quantification of bioactive compounds in such matrices is becoming of great significance.

- 8.** An HPLC-ESI-QqTOF method based on library search has been developed for the fast, automated, and robust identification of phenolic compounds, which could be a tedious and time-consuming manual task. This approach greatly facilitates, speeds up and increases the efficiency in the identification of phenolic compounds. The library was built up using the MS and MS/MS spectra, in both negative and positive ion modes, of 39 phenolic compounds. The library also includes retention time, chemical information about the compound and acquisition parameters. The applicability of the automated method was demonstrated by analysing some of the plant-derived ingredients of a dietary supplement (propolis, onion, garlic, lemon, cabbage-broccoli and borage) and a variety of phenolic compounds could successfully be identified in the extracts in less than 10 min of analysis.
- 9.** The fragmentation patterns of all the phenolic compounds included in the library, obtained by means of the Qq-TOF analyser in both negative and positive ion modes, have been studied in detail. Each family exhibited a characteristic fragmentation pattern, consequently the knowledge of the possible fragmentations may facilitate the identification of unknown phenolic compounds not included in the library. Moreover, Qq-TOF has proved to be a very useful tool in the identification and structural elucidation of compounds, since it provides mass accuracy and true isotopic pattern in both MS and MS/MS spectra.

OTRAS PUBLICACIONES

OTRAS PUBLICACIONES

Durante la etapa de formación correspondiente al desarrollo de esta tesis doctoral, he tenido la oportunidad de colaborar y trabajar con varios compañeros, también estudiantes de doctorado, lo que ha dado lugar a la publicación de una serie de trabajos no incluidos en la presente memoria, y que se enumeran a continuación

- Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., “**Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry**” J. Pharm. Biomed. Anal. 2006, 41, 1648-1656.
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez, A. “**Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material**”, J. Pharm. Biomed. Anal. 2010, 53, 1130-1160.
- Valero-Navarro, A., Gómez-Romero M., Fernández-Sánchez, J.F., Cormack, Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., “**Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and HPLC evaluation of their sorption properties**” enviado a Biosensors
- Ouchemoukh, S., Gómez-Romero, M., Aboud, F., Guisepe, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Louailechei, H., “**Identification of phenolic compounds from Algerian honeys using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry**”, en proceso de escritura.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

En la mayoría de los casos se ha escogido la variante anglosajona de las abreviaturas debido a su empleo generalizado

a	Parámetro de Freundlich
AA	Acrilamida
AAC	Ácido acético
ABDV	2,2'-azobis-(2,4-dimetilvaleronitrilo)
AD	Distribución de afinidad
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AIBN	2,2'-Azobis(isobutironitrilo)
APCI	Ionización química a presión atmosférica
ASE	Extracción acelerada con disolventes
B	Cantidad de analito unido al polímero
BET	Isoterma de adsorción de Brunauer-Emmett-Teller
BPC	Cromatograma del pico base
BPE	Electroferograma del pico base
C	Cantidad de analito que permanece libre en la disolución
CAE	Electroforesis capilar por afinidad
CAF	Ácido cafeico
CAT	Catecol
CC	Cromatografía en columna
CCC	Cromatografía en contracorriente
CCE	Electroforesis capilar quiral
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
CF-FAB	Flujo continuo y bombardeo por átomos rápidos
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Isoelectroenfoque capilar
CIN	Ácido cinámico
CITP	Isotacoforesis capilar

COUM	Ácido <i>p</i> -coumárico
CZE	Electroforesis capilar en zona
DAD	Detector de fotodiodos o diodo array
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DPPAC	Ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico
DVB-80	Divinilbenceno 80%
E	Campo eléctrico aplicado
EBE	Sector magnético
ED	Detección electroquímica
EDMA	Etilenglicol dimetacrilato
E_{Hi}	Energías de cohesión
EIC	Cromatograma del ión extraído
EIE	Electroferograma del ión extraído
ESI	Ionización por electrospray
F	Fuerza del campo eléctrico
F'	Fuerza de rozamiento
F_{Di}	Componente dispersiva de la constante de atracción
FI	Isoterma de Freundlich
FID	Detector de ionización de llama
FNFC	Alimentos con alegaciones nutricionales
FOSHU	Alimentos para usos específicos en la salud
F_{Pi}	Componente dispersiva de la constante de atracción
FT-ICR	Transformada de Fourier-resonancia ciclotrónica
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
FUFOSE	Ciencias de los Alimentos Funcionales en Europa
FWHM	Anchura total de un pico a la mitad del máximo de su altura
GC	Cromatografía de gases
H	Altura del plato teórico
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPPAC	Ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico
HSCCC	Cromatografía en contracorriente de alta velocidad
HSP	Parámetros de solubilidad de Hansen
HT-TOF	Transformada de Hadamard-tiempo de vuelo
HTY	Hidroxitirosol
ICP	Plasma acoplado inductivamente
ILSI	Instituto internacional de las ciencias de la vida
ISCID	Disociación inducida por colisión en la fuente
ISEC	Cromatografía de exclusión molecular inversa

ISP	Electrospray asistido neumáticamente
IT	Trampa de iones
IT-TOF	Trampa de iones- tiempo de vuelo
$K_{K_{\min}-K_{\max}}$	Afinidad media ponderada
$N_{K_{\min}-K_{\max}}$	Número de sitios de unión
K	Constante de afinidad
k'	Factor de capacidad
kV	Kilovoltio
L	Longitud de la columna
LC	Cromatografía líquida
LLE	Extracción líquido-líquido
<i>m</i>	Índice de heterogeneidad
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MAA	Ácido metacrílico
MAE	Extracción asistida por microondas
MALDI	Ionización y desorción por láser asistida por matriz
MeCN	Acetonitrilo
MEEKC	Cromatografía capilar electrocinética micelar con microemulsiones
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MeOH	Metanol
MF	2,5-dimetilfurano
min	Minuto
MIP	Polímero de impresión molecular
MISPE	Extracción en fase sólida mediante polímeros de impresión molecular
ml	Mililitro
MS	Espectrometría de masas
N	Número de platos teóricos
NACE	Electroforesis capilar en medios no acuosos
NIP	Polímero de control no impreso molecularmente
nl	Nanolitro
nm	Nanometros
NMR	Resonancia magnética nuclear
N_t	Densidad de sitios de unión presentes en la matriz polimérica
OT	Orbitrap
PC	Cromatografía en papel
PCA	Análisis por componentes principales
PETRA	(2Z)-N,N'-bis(2-aminoetilic)but-2-enediamida
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PLS	Mínimos cuadrados parciales

ppm	Partes por millón
q	Carga del ion
Q	Cuadrupolo
QQ	Doble cuadrupolo
QqQ	Triple cuadrupolo
Qq-TOF	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
r	Radio de la partícula o ión en disolución
R	Resolución
R ₀	Distancia entre dos parámetro de solubilidad
R ²	Coefficiente de determinación
RDA	Reacciones de retro Diels-Alder
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa
RRLC	<i>Rapid Resolution Liquid Chromatography</i> (marca registrada de Agilent Technologies)
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SLE	Extracción sólido-líquido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Micro-extracción en fase sólida
SWE	Extracción con agua subcrítica
THF	Tetrahidrofurano
TIC	Cromatograma del ión total
TLC	Cromatografía en capa fina
t _m	Tiempo muerto
TOF	Tiempo de vuelo
t _R	Tiempo de retención
TY	Tirosol
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> (marca registrada de Waters Corporation)
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen/volumen
V _i	Volumen molar
VOO	Aceite de oliva virgen
VP	4-vinilpiridina
μ _{ef}	Movilidad electroforética
μ _{eo}	Movilidad electroosmótica
w	Anchura de la base del pico cromatográfico
α	Factor de selectividad
δ _d	Interacciones dispersivas
δ _h	Interacciones por puentes de hidrógeno

δ_p	Interacciones polares
δ_t	Parámetro de solubilidad total de Hansen
ϵ	Constante dieléctrica del tampón,
ζ	Potencial zeta
η	Viscosidad
μl	Microlitro
μm	Micra
v	Velocidad aparente de migración
v_{ef}	Velocidad electroforética
v_{eo}	Velocidad electroosmótica

