

**NUEVA APLICACIÓN DE MATERIALES
MESOPOROSOS COMO ADSORBENTE EN
MSPD PARA LA DETERMINACIÓN DE
HORMONAS ESTEROIDEAS EN LECHE DE
CABRA POR MECK**

**Mariana Silva, Judith Gañán,
Sonia Morante-Zarcero, Damián Pérez-
Quintanilla, Isabel Sierra**

*Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Escuela Superior de
Ciencias Experimentales y Tecnología, Universidad Rey Juan Carlos*

- 1. INTRODUCCIÓN
- 2. OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO
- 3. PARTE EXPERIMENTAL
- 4. CONCLUSIONES





1. INTRODUCCIÓN

COMPUESTOS ANABOLIZANTES

Grupo A Ia:	
Estilbenos	Dietilestilbestrol (DES)
	Dienestrol (DE)
	Hexestrol (HEX)
Grupo A II:	
Hormonas naturales	17 β -Estradiol (E ₂), estriol (E ₃), estrona (E ₁), etc
	Andrógenos: Testosterona (T)
	Prostágenos: Progesterona (P)
Grupo A Ic:	
Xenobióticos	Trembolona
	Zenarol
	Etinilestradiol

PROHIBIDOS por la comisión europea (CE) según la DIRECTIVA 85/649

PRODUCEN:

- Desajustes hormonales
- Cáncer de mama y útero
- Cáncer testicular

Principales sustancias anabolizantes incluidas en el RD 1262/1989.

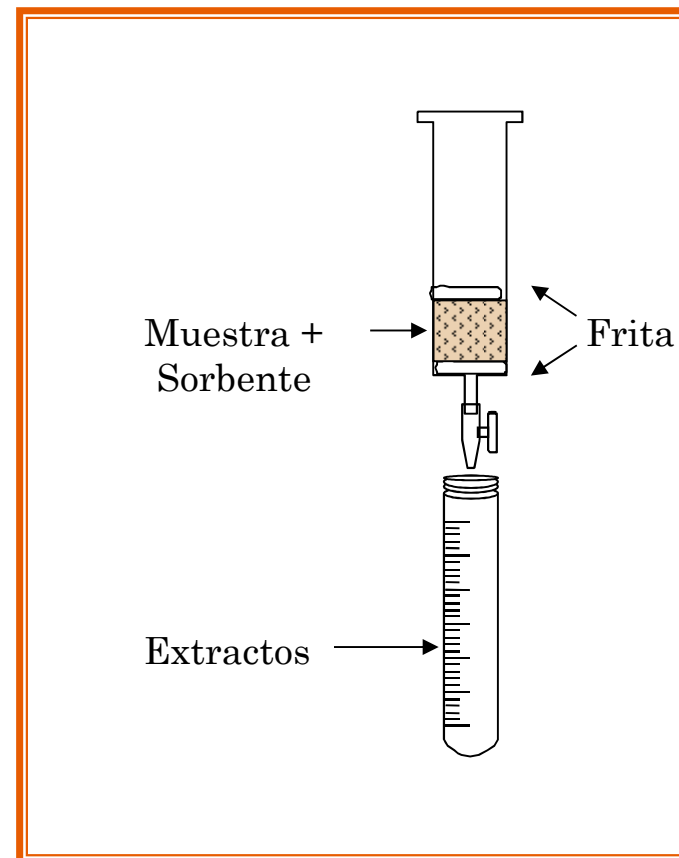


DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA (MSPD)

- Técnica de preparación de la muestra
- Barker en 1989
- Permite su completa disgregación y dispersión y una extracción selectiva

VENTAJAS:

- Reduce el gasto de disolventes de extracción
- Bajo tiempo de preparación de muestra
- Evita la presencia de interferencias



ADSORBENTES COMUNES EN MSPD

Matriz	Analito	Adsorbente	Referencia
Leche de vaca	3 antibióticos	Sílice funcionalizada con C18	G. Mu, (2011) Food Anal. Methods, 5, 418-153
Leche de vaca y huevos	Nonyfenol, Octylfenol y Bisfenol A	Sílice funcionalizada con C18	B. Shao (2006), J. Chromatogr. B, 850, 412-416
Leche de oveja	7 antibióticos	Arena de mar	M.A. García-Mayor, (2012) Food Chem., 134, 553-558
Leche de vaca	Cocidiostatos	Sílice funcionalizada con C8	S. Nász, (2012) Food Chem., 133, 536-543
Leche de vaca	2 glucocorticoides	Sílice funcionalizada con C2	E. Dési, (2007), Microchemical Journal, 89, 77-81
Leche de vaca	Melanina	MIP	H. Yan, (2012) J. Chromatogr. B, 908, 137-142
Leche de cabra	E2	MIP	J. Gañán, (2012) Anal. Bioanal. Chem. 403 (10) 3025-3029

SÍLICES MESOPOROSAS

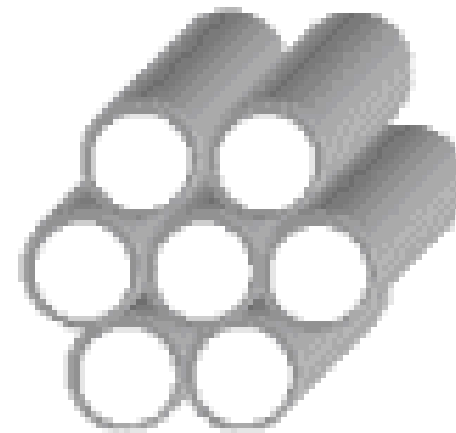
Materia MESOPOROSO: IUPAC material con diámetro de poro comprendido entre 2 y 50 nm

Características sílices mesoporosas:

- Poros homogéneos de tamaño nanométrico (2-50 nm)
- Estrecha distribución de poro
- Elevada superficie específica
- Alta estabilidad térmica, mecánica y química
- Fácilmente modificables con reactivos orgánicos (sílices híbridas)

Aplicaciones:

- Liberación controlada de fármacos
- Catálisis
- Adsorción de contaminantes
- Fases estacionarias en cromatografía
- Tratamiento de muestra (SPE, MSPD, etc.)





2. OBJETIVOS E INTERÉS DEL TRABAJO

Desarrollar un método de extracción y limpieza de la muestra, MSPD, para la determinación de testosterona, progesterona, estrona, estradiol y etinilestradiol en muestras de leche de cabra.

Controlar la presencia de residuos de hormonas en muestras de leche de cabra

Minimizar el tratamiento de este tipo de muestras





3. PARTE EXPERIMENTAL

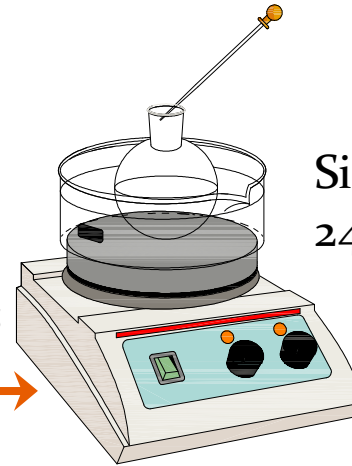
SÍNTESIS SBA-15

Pluronic 123
+
HCl
+
Agua Milli-Q

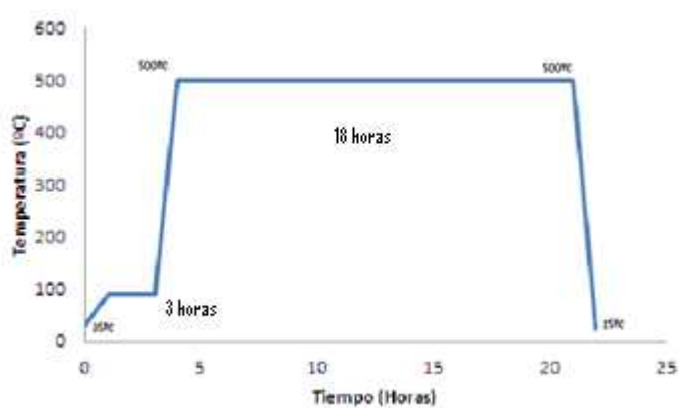


Agitación 25°C,
1000 rpm

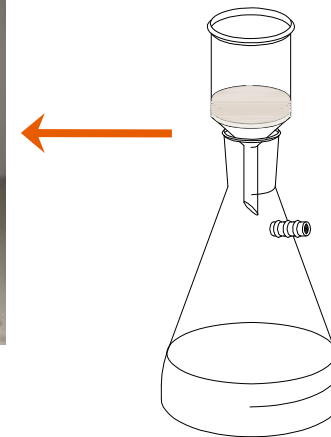
TEOS gota a
gota
Agitación
35°C, 20 horas



Sin agitación 80°C,
24 horas



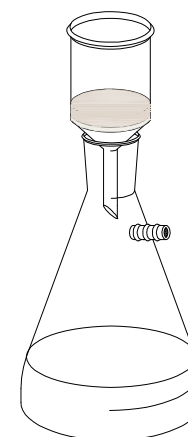
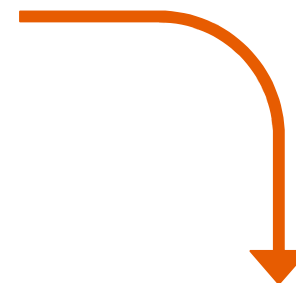
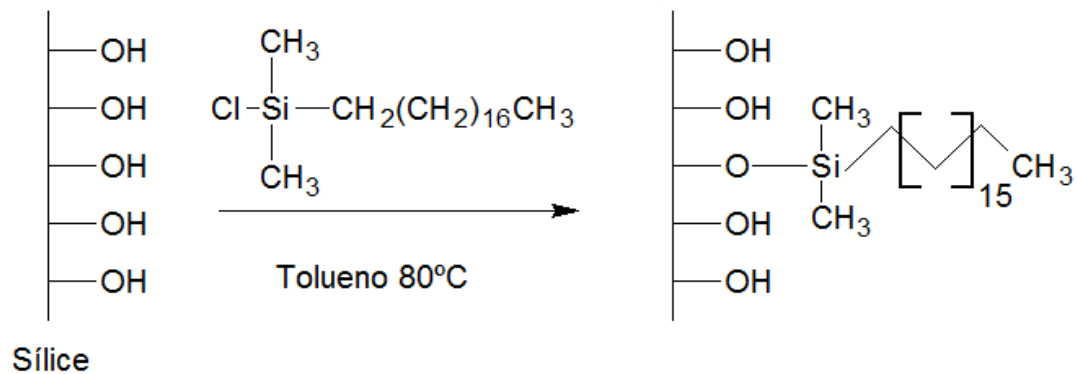
Calcinación



Lavado
con
H₂O



FUNCIONALIZACIÓN SBA-15



Lavado con
tolueno,
etanol y éter
etílico

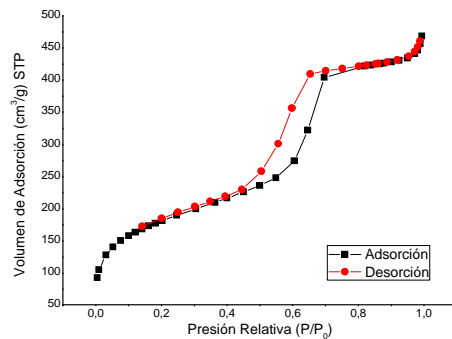


SBA-15-C18

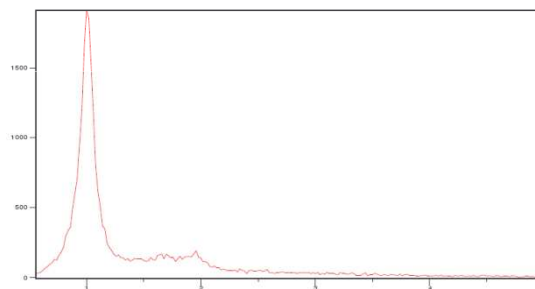


CARACTERIZACIÓN DE LA SÍLICE

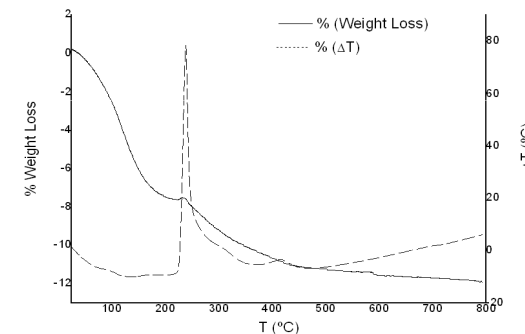
Material	S_{BET} (m^2/g)	V_p (cm^3/g)	D_p (\AA)	L_o ($\text{mmolC}_{18}/\text{g}$)	%C
SBA-15	830	0.81	64.2	-	-
SBA-15- C ₁₈	645	0.68	63.7	0.257	3.85



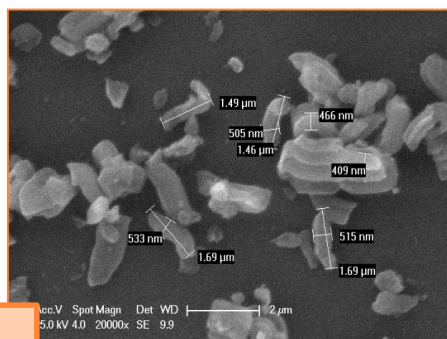
Isoterma de adsorción



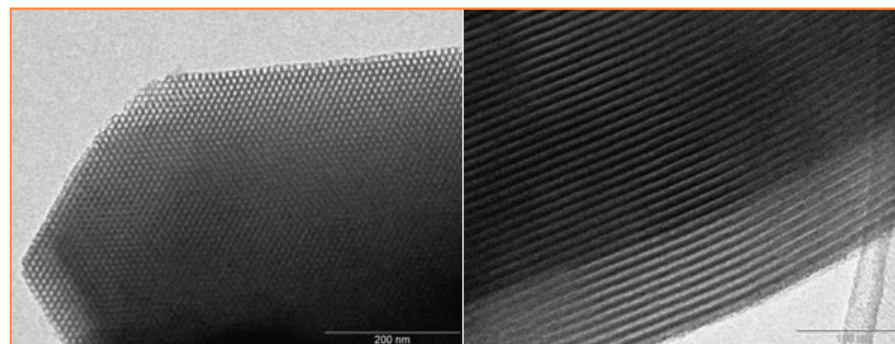
Difracción de Rayos X



Termogravimetría



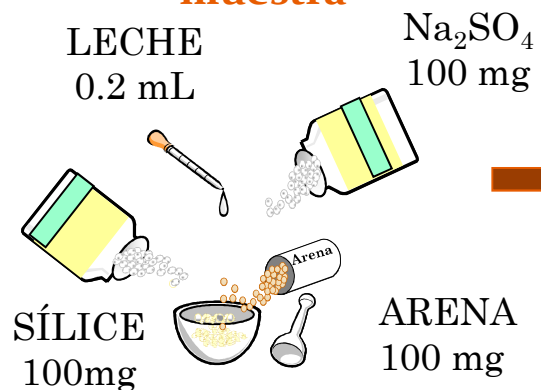
SEM



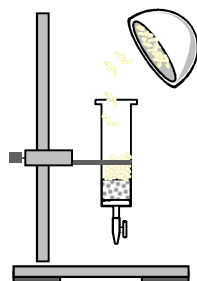
TEM

MSPD

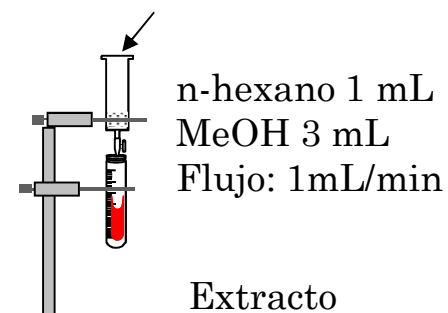
Homogenización de la muestra



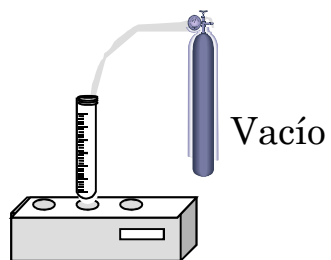
Carga de la muestra



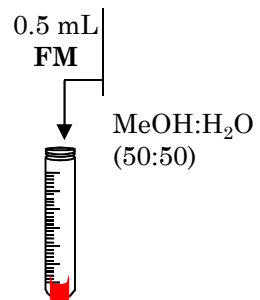
Lavado y elución de los analitos



Evaporación del disolvente



Reconstitución de la muestra



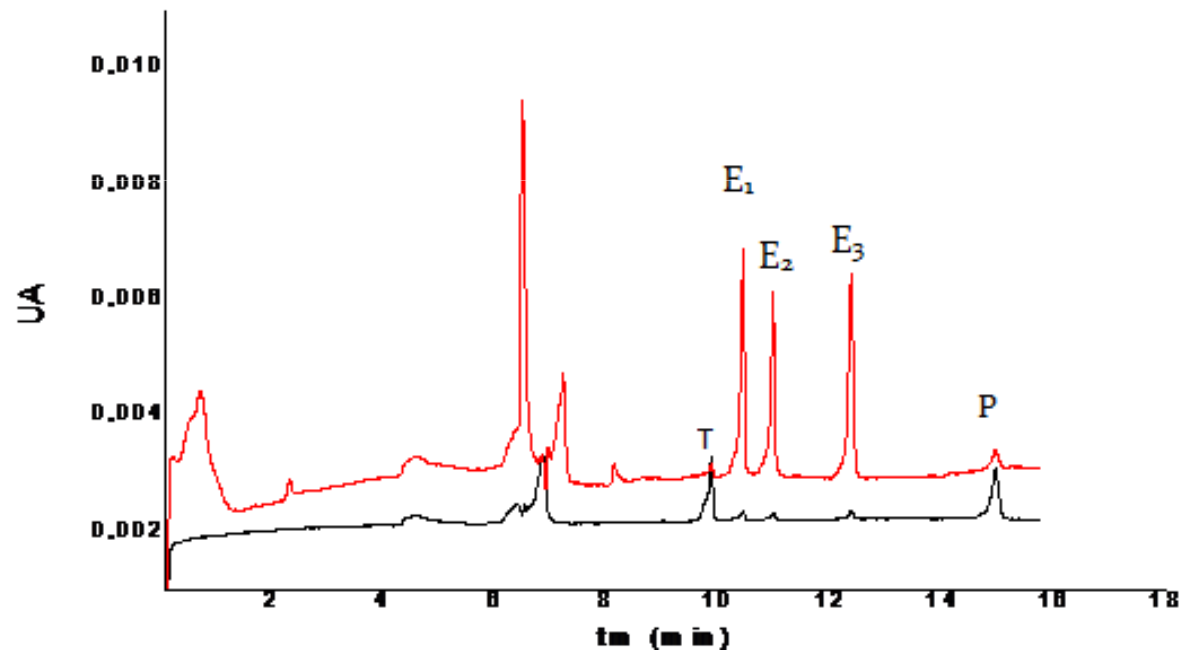
Determinación analítica



MECK

CONDICIONES DE TRABAJO

- Electroforesis capilar: PACE-MDQ (Beckman coulter)
- Trabajo BGE: Buffer borato 25 mM pH= 9.3 + 20 mM SDS+ 10 % ACN
- Voltaje: 27 KV
- T^a: 15°C
- Capilar: 75 µm i.d., 50 cm e.l.



Electroforegrama de disolución patrón de hormonas



CONDICIONES DE TRABAJO

MATERIALES ESTUDIADOS

SILICA GEL COMERCIAL

SILICA GEL COMERCIAL FUNCIONALIZADA C₁₈

SÍLICE MESOPOROSA

SÍLICE MESOPOROSA FUNCIONALIZADA C₁₈

Ensayos preliminares comparativos:

Porcentajes de recuperación menores en las condiciones ensayadas
Se descartaron las sílices amorfas



OPTIMIZACIÓN ETAPA LAVADO Y ELUCIÓN

	LAVADO	ELUCIÓN	Testosterona	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona
SBA-15-c18	-	1 ml MeOH	52	50	42	44	50
	1 ml NaOH 0,5M	1 ml MeOH	-	7	26	27	-
	2 ml NaOH 0,5M	1 ml MeOH	6	12	33	31	2
	1 ml n- hexano	1 ml MeOH	57	52	48	61	54
	1 ml n- hexano	1 ml AcN	36	39	35	30	25
	1 ml n- hexano	1 ml MeOH 1%HaC	-	-	-	-	-
	1 ml n- hexano	1 ml MeOH:AcET (50:50)	-	-	-	-	-

OPTIMIZACIÓN ETAPA LAVADO Y ELUCIÓN

	LAVADO	ELUCIÓN	Testosterona	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona
SBA-15	-	1 ml MeOH	43	36	35	44	39
	1 ml NaOH 0,5M	1 ml MeOH	-	8	5	4	-
	2 ml NaOH 0,5M	1 ml MeOH	-	13	10	8	-
	1 ml n- hexano	1 ml MeOH	44	37	42	49	37
	1 ml n- hexano	1 ml AcN	*	*	*	*	*
	1 ml n- hexano	1 ml MeOH 1%HaC	*	*	*	*	*
	1 ml n- hexano	1 ml MeOH:AcET (50:50)	*	*	*	*	*

* Cuantificación sobreestimada por la elevada presencia de impurezas

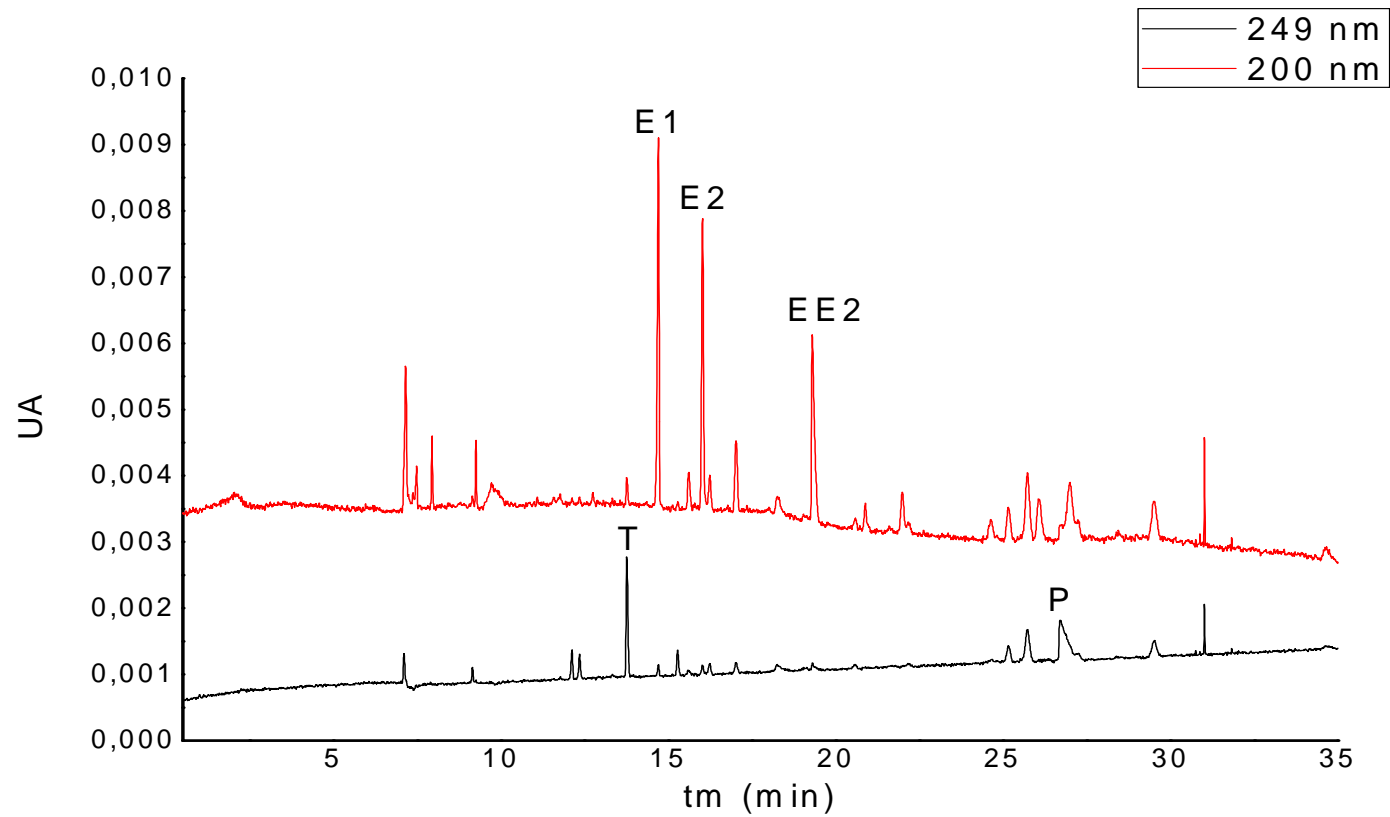
OPTIMIZACIÓN DEL VOLUMEN DE ELUCIÓN

	LAVADO	ELUCIÓN	Testosterona	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona
SBA-15-C18	1 ml n-hexano	1 ml MeOH secando	57 ± 3	52 ± 5	48 ± 4	61 ± 25	54 ± 7
	1 ml n-hexano	3 ml MeOH secando	70 ± 8	70 ± 5	72 ± 1	72 ± 7	100 ± 13
	1 ml n-hexano	5 ml MeOH secando					

	LAVADO	ELUCIÓN	Testosterona	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol	Progesterona
SBA-15	1 ml n-hexano	1 ml MeOH secando	44 ± 31	37 ± 29	42 ± 17	49 ± 22	37 ± 21
	1 ml n-hexano	3 ml MeOH secando	72 ± 28	46 ± 5	54 ± 45	81 ± 10	58 ± 9
	1 ml n-hexano	5 ml MeOH secando	68 ± 7	92 ± 2	58 ± 7	77 ± 8	75 ± 9

Electroforegrama obtenido con las condiciones optimizadas

Muestra de leche de cabra





4. CONCLUSIONES

1. Método rápido, sencillo y eficaz de tratamiento de muestra y extracción selectiva (MSPD) empleando sílices mesoporosas y cuantificación por MECK

2. *Alternativa* a métodos convencionales para el tratamiento este tipo de muestras:

- Auna extracción, elución y purificación*
- ↓ consumo de disolventes
 - ↓ manipulación de la muestra



MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN



UNION EUROPEA
FONDO SOCIAL EUROPEO



*Este trabajo ha sido financiado por el proyecto
S2009/AGR-1464, ANALISYC-II (Comunidad de Madrid)*