

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/19
I.S.B.N.: 978-84-7756-960-2

AURORA MARTÍN CALERO

**Desarrollo y optimización de nuevos métodos
para el análisis de aminas heterocíclicas**

Directores

**ANA M. AFONSO PERERA
JUAN H. AYALA DÍAZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

Considero que una Tesis, afortunadamente, no es un camino que se recorra en solitario, y yo tengo, Gracias a Dios, muchas personas a las que agradecer el que me hayan acompañado y ayudado durante todo este tiempo. Ha llegado el momento de agradecerse.

A mi lado, y guiándome pasito a pasito, he tenido a dos personas fundamentales en el desarrollo de este trabajo y que son mis Directores, la Dra. Ana M. Afonso Perera y el Dr. Juan H. Ayala Díaz. A Ana quiero agradecerle su gran dedicación, su paciencia y el que me haya permitido aprender a su lado; y por encima de todas estas cosas, el cariño y el apoyo que me ha dado siempre, tanto en lo profesional como en lo personal. Eres el alma de este trabajo. A Juan quiero agradecerle su gran ayuda en los problemas del día a día, todo el tiempo que ha dedicado a esta Tesis, su paciencia y, lo más importante, su calidad humana. Gracias por todo.

Me gustaría agradecer al Dr. Venerando González Díaz el haberme dado la oportunidad de entrar a formar parte del grupo de investigación Química Analítica, Agroalimentaria y Medioambiental, del cual es investigador principal. Gracias por todo su apoyo, por compartir tantos y tantos cafés y por todas esas cosas que he aprendido de él en el día a día. Muchas gracias.

A los compañeros de laboratorio que me han precedido, los Dres. Verónica Pino y Francisco Conde, a Lourdes, vuestro ejemplo me ha ayudado mucho. Especialmente, me gustaría agradecerle a Verónica su inestimable ayuda y sus palabras de ánimo en el día a día. Y a todos con los que comparto el laboratorio diariamente, Bárbara, Raquel, Arturo, Jessica, Mónica y Diana, gracias por hacer muy ameno el trabajo en el laboratorio. Me gustaría agradecer de forma muy especial a Bárbara la amistad y el cariño recibido, por estar ahí en los buenos y malos momentos y por ser una excelente compañera de congresos. Asimismo, me gustaría agradecerle a Raquel su sonrisa permanente, que hace que todos nos sintamos mejor.

Me gustaría agradecer a los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, y de forma especial, a la Dra. Maite Sanz y a los compañeros de Tercer Ciclo, que durante este tiempo, de una manera u otra han puesto su granito de arena y han hecho posible la realización de esta Tesis.

Quisiera agradecer a todos los miembros del Servicio de Medioambiente de la Universidad de La Laguna (SEMALL) por haber compartido conmigo todo este tiempo. En especial a Celi y Carmen, muchas gracias por todo, sobre todo por esos buenos momentos compartidos.

A la Consejería de Industria, Comercio y Nuevas Tecnologías del Gobierno de Canarias por el contrato de investigación para Tecnólogos, y a CajaCanarias por la beca para doctorandos, que me han permitido llevar a cabo esta investigación.

Quiero concluir agradeciendo a aquellas personas que, sin saber nada de Química, disfrutan de cada logro, congreso, publicación, etc. Y que también sufren cada pequeña desilusión que trae consigo el mundo de la investigación. A mi Familia.

A Sara, Sagrario y Felipe, gracias por todo el cariño recibido durante todo este tiempo y por haberme acogido como una más desde el principio. Gracias por todo.

A mis tíos y primos, por todo su apoyo, su cariño y su preocupación.

A mi Madrina, porque sé, que aunque en la distancia, siempre está pendiente de mí. Gracias por todo tu cariño.

A los que ya no están y hoy extraño muchísimo. Están siempre en mi corazón y mis recuerdos. Un beso, Abuelos.

A mis hermanos, María y Braulio, a los que quiero mucho, vuestra presencia, ayuda y comprensión han sido y serán muy importantes para mí.

A mis Padres, Luis y Carmen, gracias a ellos soy como soy. Gracias por dárme todo y por apoyarme incondicionalmente en esta locura que empezó el día que les dije que quería estudiar Química. Sin vuestra ayuda y cariño esta Tesis no hubiera sido posible.

Y por último me gustaría agradecer a la persona que me acompaña desde prácticamente el principio de esta Tesis y que desde entonces camina a mi lado. A ti Javier. Gracias por aguantar esos días en los que las cosas no salen bien, por alegrarte conmigo y por escuchar mis reflexiones en voz alta, por cuidarme y por enseñarme que hay un mundo que empieza ahí fuera. Gracias por tu paciencia.

A todos os estaré siempre agradecida.

A la Memoria de mis Abuelos.

A mis Padres y Hermanos.

Y a ti, Javier.

Índice

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1 AMINAS HETEROCÍCLICAS (AHS)	3
<i>I.1.1 Formación de las Aminas Heterocíclicas</i>	10
<i>I.1.2 Factores que afectan la formación de Aminas Heterocíclicas en alimento</i>	15
I.2 TOXICIDAD DE LAS AMINAS HETEROCÍCLICAS	23
<i>I.2.1 Carcinogénesis de los alimentos</i>	23
<i>I.2.2 Importancia de las Aminas Heterocíclicas en la salud humana</i>	26
<i>I.2.3 Estudios epidemiológicos</i>	29
I.3 METABOLISMO DE LAS AMINAS HETEROCÍCLICAS	33
<i>I.3.1 Aspectos metabólicos de las AHs y su posible implicación en el riesgo de desarrollo del cáncer</i>	33
I.4 NIVELES DE LAS AMINAS HETEROCÍCLICAS EN ALIMENTOS	37
I.5 ANÁLISIS DE AMINAS HETEROCÍCLICAS	43
<i>I.5.1 Tratamiento de las muestras</i>	43
I.6 SEPARACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS	57
<i>I.6.1 Cromatografía de gases (GC)</i>	57
<i>I.6.2 Cromatografía líquida (LC)</i>	60
<i>I.6.3 Métodos de cromatografía en capa fina (HPTLC)</i>	67
<i>I.6.4 Electroforesis capilar (CE)</i>	67
I.7 OBJETIVOS GENERALES	69
I.8 BIBLIOGRAFÍA	73

CAPÍTULO II. ACOPLAMIENTO SPME-HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS.....	85
II.1 INTRODUCCIÓN.....	87
II.1.1 <i>Microextracción en Fase Sólida.....</i>	87
II.1.2 <i>Acoplamiento de SPME con técnicas de separación</i>	98
II.1.3 <i>Objetivos.....</i>	101
II.2 DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ACOPLADA A HPLC CON DETECCIÓN VIS-UV.....	103
II.2.1 <i>Separación cromatográfica.....</i>	103
II.2.2 <i>Microextracción en fase sólida de AHs.....</i>	104
II.2.3 <i>Optimización del método SPME-HPLC por Diseños Experimentales</i>	110
II.2.4 <i>Parámetros de calidad del método SPME-HPLC con detección Vis-UV optimizado</i>	120
II.2.5 <i>Determinación de AHs en extractos de carne comerciales mediante SPME-HPLC con detección Vis-UV.....</i>	122
II.3 DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ACOPLADA A HPLC CON DETECCIÓN FLUORESCENTE.....	125
II.3.1 <i>Método SPME-HPLC con detección fluorescente.....</i>	125
II.3.2 <i>Parámetros de calidad del método SPME-HPLC con detección fluorescente.....</i>	129
II.3.3 <i>Determinación de AHs en extractos de carne comerciales mediante una extracción asistida por ultrasonidos seguida de SPME-HPLC con detección fluorescente</i>	131
II.4 DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ACOPLADA A HPLC CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA VERSUS INYECCIÓN DIRECTA.....	145
II.4.1 <i>Optimización de las condiciones cromatográficas.....</i>	146
II.4.2 <i>SPME-HPLC-detección electroquímica.....</i>	153
II.4.3 <i>Parámetros de calidad del método analítico HPLC con detección electroquímica mediante inyección directa.....</i>	158

II.4.4	<i>Determinación de AHs en extractos de carne comerciales mediante una extracción asistida por microondas focalizadas</i>	160
II.5	BIBLIOGRAFÍA	169

CAPÍTULO III. APLICACIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS MEDIANTE HPLC 173

III.1	INTRODUCCIÓN.....	175
III.1.1	<i>Generalidades de los Líquidos Iónicos</i>	175
III.1.2	<i>Propiedades fisicoquímicas de los Lis</i>	177
III.1.3	<i>Aplicaciones generales de los Lis</i>	180
III.1.4	<i>Aplicaciones de los Lis en Química Analítica</i>	181
III.1.5	<i>Reducción de las interacciones silanofílicas en HPLC con el uso de los Lis</i>	192
III.1.6	<i>Objeto del trabajo</i>	197
III.2	LÍQUIDOS IÓNICOS COMO ADITIVOS A LA FASE MÓVIL PARA LA DETERMINACIÓN DE AHs MEDIANTE HPLC CON DETECCIÓN VIS-UV Y FLUORESCENTE	199
III.2.1	<i>Separación cromatográfica</i>	201
III.2.2	<i>Comportamiento óptico de las AHs en presencia de Lis</i>	202
III.2.3	<i>Líquidos iónicos de la familia alquilimidazolío como aditivos de la fase móvil en HPLC</i>	210
III.2.4	<i>Características analíticas de los métodos cromatográficos con la utilización de Lis como aditivos a la fase móvil</i>	234
III.3	LÍQUIDOS IÓNICOS COMO ADITIVOS A LA FASE MÓVIL PARA LA DETERMINACIÓN DE AHs MEDIANTE HPLC CON DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA	237
III.3.1	<i>Influencia de los Lis en la respuesta del detector electroquímico. Curvas intensidad-potencial</i>	237
III.3.2	<i>Efecto de los Lis en los factores de retención, área, altura y ancho de pico</i>	239
III.3.3	<i>Efecto de los Lis en la eficacia y simetría de los picos</i>	249

III.3.4	<i>Influencia del contenido de disolvente orgánico en la fase móvil cuando se emplean LIs como aditivos</i>	252
III.3.5	<i>Características analíticas de los métodos cromatográficos cuando se emplean LIs como aditivos a la fase móvil</i>	261
III.3.6	<i>Determinación de AHs en alimentos cárnicos infantiles mediante HPLC con detección electroquímica</i>	265
III.4	LÍQUIDOS IÓNICOS COMO DISOLVENTES DE DESORCIÓN, SUPRESORES DEL EFECTO MEMORIA Y ADITIVOS A LA FASE MÓVIL EN EL ACOPLAMIENTO SPME-HPLC CON DETECCIÓN FLUORESCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE AHS	273
III.4.1	<i>Separación cromatográfica</i>	274
III.4.2	<i>Optimización del proceso SPME-HPLC utilizando BMIm-BF₄ como disolvente de desorción y supresor del efecto memoria</i>	275
III.4.3	<i>Características analíticas del método SPME-HPLC optimizado</i>	286
III.4.4	<i>Aplicación en muestras de alimentos</i>	288
III.5	BIBLIOGRAFÍA	291
 CAPÍTULO IV. PARTE EXPERIMENTAL		301
IV.1	REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MATERIALES	303
IV.1.1	<i>Reactivos</i>	303
IV.1.2	<i>Materiales</i>	304
IV.1.3	<i>Muestras</i>	304
IV.2	EQUIPAMIENTO	307
IV.3	PROCEDIMIENTOS	309
IV.3.1	<i>Separación cromatográfica de las AHs</i>	309
IV.3.2	<i>Empleo de Líquidos Iónicos (LIs) como aditivos a la fase móvil para la determinación de las AHs mediante HPLC. Condiciones cromatográficas</i>	311
IV.3.3	<i>SPME-HPLC para la determinación de AHs</i>	313
IV.3.4	<i>SPME-HPLC con detección fluorescente empleando LIs como aditivos a la fase móvil y como disolventes de desorción</i>	314

IV.4 TRATAMIENTO DE MUESTRA	317
IV.4.1 <i>Enriquecimiento de las muestras</i>	317
IV.4.2 <i>Extracción asistida por ultrasonidos</i>	317
IV.4.3 <i>Extracción asistida por microondas focalizadas</i>	317
CONCLUSIONES	319
C.1 ACOPLAMIENTO SPME-HPLC CON DETECCIÓN VIS-UV, FLUORESCENTE Y ELECTROQUÍMICA.....	321
C.1.1 <i>Acoplamiento SPME-HPLC con detección Vis-UV</i>	321
C.1.2 <i>Acoplamiento SPME-HPLC con detección fluorescente</i>	322
C.1.3 <i>Acoplamiento SPME-HPLC con detección electroquímica versus inyección directa</i>	324
C.2 LÍQUIDOS IÓNICOS COMO ADITIVOS A LA FASE MÓVIL	326
C.2.1 <i>Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de AHs mediante HPLC con detección Vis-UV y fluorescente</i>	326
C.2.2 <i>Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de AHs mediante HPLC con detección Electroquímica</i>	327
C.2.3 <i>Líquidos Iónicos como disolventes de desorción, supresores del efecto memoria y aditivos a la fase móvil en el acoplamiento SPME-HPLC con detección fluorescente para la determinación de seis AHs</i>	329
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	331
ANEXO	337
A.1. COMUNICACIONES A CONGRESOS	339
A.2. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	340

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN GENERAL



I.1. Aminas Heterocíclicas

I.2. Toxicidad de las Aminas Heterocíclicas

I.3. Metabolismo de las Aminas Heterocíclicas

I.4. Niveles de las Aminas Heterocíclicas en alimentos

I.5. Análisis de Aminas Heterocíclicas

I.6. Separación de Aminas Heterocíclicas

I.7. Objetivos Generales

I.8. Bibliografía

I.1 Aminas Heterocíclicas (AHs)

Numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que entre el 30 y el 40% de los cánceres están relacionados con la dieta. La exposición continuada a las sustancias mutagénicas presentes en alimentos puede causar alteraciones genéticas que terminan derivando en el desarrollo de dicha enfermedad [1, 2].

Entre los precursores del cáncer se encuentran los llamados tóxicos derivados, es decir, sustancias que poseen carácter tóxico y que, mediante procesos químicos o enzimáticos, se forman en los alimentos durante las etapas de procesado, preparación y almacenamiento. Entre los tóxicos derivados se incluyen un número importante de compuestos originados en tratamientos a temperaturas elevadas. Entre ellos, destacan, por ser cancerígenos reconocidos o potenciales, distintos componentes de familias de compuestos como las aminas heterocíclicas (AHs).

La presencia de AHs en los alimentos suele deberse a procesos en los que se produce el calentamiento de aminoácidos, proteínas, creatinina y azúcares. Su formación depende de la temperatura y tiempo de calentamiento, pH, tipo y concentración de los precursores y la presencia de ciertos iones divalentes [3-7]. Las primeras referencias sobre la actividad mutagénica de estos compuestos datan de hace unos 30 años.

Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado más de 25 AHs como potentes mutágenos en el test de Ames/Salmonella [8]. Todas estas aminas heterocíclicas contienen de dos a cinco (generalmente 3) anillos aromáticos condensados con uno o más átomos de nitrógeno y, generalmente, un grupo amino exocíclico.

Estas AHs son mutagénicas no solamente para bacterias, sino también para algunos sistemas celulares de mamíferos. Incluso, algunas de ellas muestran una actividad mutagénica superior en bacterias y ciertos animales que los mutágenos típicos como el benzo(a)pireno o aflatoxin B1.

En 1993, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) [9] consideró ocho de las AHs estudiadas (MeIQ, MeIQx, PhIP, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2 y Glu-P-1) como posibles cancerígenos humanos (clase 2B) y a una de ellas (IQ) como un

cancerígeno probable (clase 2A) y se recomendó reducir la exposición a estos compuestos. Más recientemente, en 2004, IQ, MeIQ, MeIQx y PhIP fueron registrados en la NTP 11th Report on Carcinogens como posibles carcinógenos humanos [10]. Aunque las evidencias epidemiológicas sugieran que un consumo de carnes muy cocinadas al grill está asociado con un aumento en el riesgo de cáncer, los datos son insuficientes para apoyar la conclusión de que este riesgo se deba específicamente a MeIQ, IQ o PhIP, presentes en estos alimentos. Estudios caso-control muestran resultados muy contradictorios. En cualquier caso, es importante disponer de datos fiables sobre el contenido de estas AHs en diferentes tipos de alimentos preparados de diversas maneras, para estudiar los efectos asociados con su consumo [10].

El descubrimiento de estos compuestos mutagénicos tuvo lugar gracias a los estudios que Sugimura *et al* [11] realizaron en 1977 sobre la composición de los humos derivados de la cocción de alimentos. Estos estudios estaban impulsados por el reciente desarrollo del test de Ames, que permitía cuantificar la actividad mutagénica de sustancias mediante el uso de bacterias [12]. La mutagenicidad de las partículas retenidas en filtros de fibra de vidrio, a través de los cuales se hacía pasar el humo desprendido de la cocción de pescados, era mayor de lo esperado, teniendo en cuenta los compuestos carcinógenos conocidos hasta ese momento. Al aislarse los compuestos resultantes del aumento de la carcinogenicidad, estos autores se encontraron con unos compuestos con propiedades básicas y estructura aromática con heteroátomos, de ahí el nombre de aminas heterocíclicas.

La formación de estos compuestos depende en gran medida de la temperatura, y por eso, las AHs se clasifican en dos grupos teniendo en cuenta este aspecto:

- **Aminas térmicas, tipo IQ o aminoimidazoarenos (AIAs).** Se generan a partir de la reacción de aminoácidos libres, creatina, creatinina y hexosas, a temperaturas de cocción ordinarias, entre 100 y 300°C. Estas aminas contienen en su estructura un grupo metilaminoimidazólico. Los mutágenos incluidos en este grupo (piridinas, quinolinas y quinoxalinas) son los más frecuentemente encontradas en la carne y el pescado cocinado, por lo tanto son los que contribuyen mayormente a la mutagenicidad de este tipo de alimentos. A temperaturas superiores a 225-250°C estas aminas se degradan o reaccionan con otros compuestos [13, 14]. En la Tabla I.1.1 se recogen las estructuras de las aminas térmicas, así como su nomenclatura y la abreviatura por la cual son conocidas.

Tabla I.1.1. Estructura y nomenclatura de las aminas térmicas.

Amina	Abreviatura	Estructura
Piridinas		
2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	DMIP	
2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	1,5,6-TMIP	
2-amino-3,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	3,5,6-TMIP	
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	PhIP	
2-amino-1-metil-6-(4'-hidroxifenil)-imidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	4'-OH-PhIP	
2-amino-1,6-dimetil-furo[3,2- <i>e</i>]imidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	IFP	
Quinolinas		
2-amino-1-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolina	iso-IQ	
2-amino-3-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolina	IQ	
2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolina	MeIQ	

Tabla I.1.1. Estructura y nomenclatura de las aminas térmicas (cont.).

Amina	Abreviatura	Estructura
2-amino-1-metil-imidazo[4,5- <i>b</i>]-quinolina	IQ[4,5- <i>b</i>]	
Quinoxalinas		
2-amino-3-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	IQx	
2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	4-MeIQx	
2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	8-MeIQx	
2-amino-3,7,8-trimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	7,8-DiMeIQx	
2-amino-3,4,8-trimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	4,8-DiMeIQx	
2-amino-4-hidroximetil-3,8-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	4-CH2OH-8-MeIQx	
2-amino-3,4,7,8-tetrametil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	TriMeIQx	

Tabla I.1.1. Estructura y nomenclatura de las aminas térmicas (cont.).

Amina	Abreviatura	Estructura
2-amino-1-metil-imidazo[4,5-g]- quinoxalina	IgQx	
2-amino-1,7-dimetil-imidazo[4,5-g]- quinoxalina	7-MeIgQx	
2-amino-1,6,7-dimetil-imidazo[4,5-g]- quinoxalina	6,7-DiMeIgQx	
2-amino-1,7,9-trimetil-imidazo[4,5-g]- quinoxalina	7,9-DiMeIgQx	

- **Aminas pirolíticas o tipo no-IQ.** Su formación tiene lugar a través de reacciones pirolíticas entre aminoácidos y proteínas. La pirólisis ocurre a temperaturas superiores a 300°C y produce muchos fragmentos reactivos a través de reacciones radicalarias. Estos fragmentos se cree que se condensan para formar nuevas estructuras heterocíclicas, y los mutágenos pirolíticos se deben formar a partir de reacciones con radicales libres. Algunos de estos mutágenos, conocidos como carbolinas, contienen una mitad de aminopiridina como estructura común. En la Tabla I.1.2 se muestran las estructuras y nomenclatura de las aminas pirolíticas, así como la abreviatura por la cual son conocidas.

Tabla I.1.2. Estructura y nomenclatura de las aminas pirolíticas.

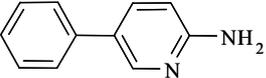
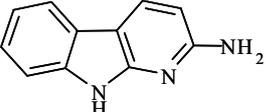
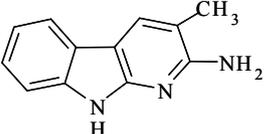
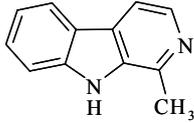
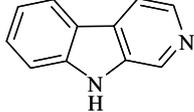
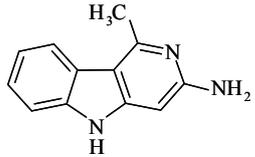
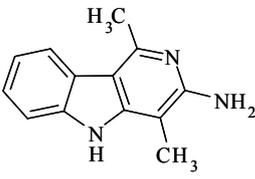
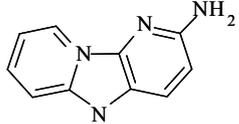
Amina	Abreviatura	Estructura
Fenilpiridina		
2-amino-5-fenilpiridina	Phe-P-1	
Piroindoles		
α-carbolinas		
2-amino-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol	A α C	
2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol	MeA α C	
β-carbolinas		
1-metil-9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol	H	
9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol	NH	
γ-carbolinas		
3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-2	
3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3- <i>b</i>]-indol	Trp-P-1	
Piridoimidazoles		
δ - carbolinas		
2-aminodipirido-[1,2- α :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-2	

Tabla I.1.2. Estructura y nomenclatura de las aminas pirolíticas (cont.).

Amina	Abreviatura	Estructura
2-amino-6-metildipirido-[1,2- α :3',2'- d]imidazol	Glu-P-1	
Tetraazafluoranteno		
4-amino-6-metil-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranteno	Orn-P-1	
Benzimidazol		
4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1H,6H-pirrolo-[3,4-f]benzimidazol-5,7-diona	Cre-P-1	
Carbazol		
3,4-ciclopenteno-pirido[3,2-a]carbazol	Lys-P-1	

De acuerdo con el comportamiento químico, estos compuestos se pueden agrupar como aminas polares (aminoimidazoazarenos junto con Glu-P-1 y Glu-P-2) y aminas no polares, entre las que se incluirán todas las restantes.

Muchas de estas AHs han sido aisladas de alimentos proteicos incluyendo carnes y pescados cocinados [15-17], extractos de carne o aromatizantes [18-20] y alimentos infantiles [21]. También están presentes en café [22], bebidas alcohólicas [23], y en fuentes medioambientales, como los humos de cocción [24, 25], humo de tabaco [26, 27], aire [28], agua de río y lluvia [29, 30]. Además, algunas AHs han sido detectadas en tejidos humanos

[31], pelo [32] y fluidos biológicos, como plasma, orina o bilis [33-35], así como en leche de mujeres sanas [36, 37].

1.1.1 Formación de las Aminas Heterocíclicas

Química de la formación de las AHs

La cocción de la carne y pescado generalmente mejora sus cualidades organolépticas, ya que durante este proceso los alimentos se oscurecen y se generan sustancias de agradable olor y sabor. En 1916 Maillard propuso la reacción de oscurecimiento o *browning* para explicar los pigmentos y polímeros oscuros producidos en la reacción entre los grupos amino de los aminoácidos y el grupo carbonílico de un azúcar [38].

La reacción de Maillard (glucosilación no enzimática de proteínas) se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores que se dan al calentar los alimentos. Se trata básicamente de una especie de caramelización de los alimentos y es la misma reacción que colorea de marrón la superficie de la carne mientras se cocina al horno. Los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas cíclicas y policíclicas, que aportan sabor y aroma a los alimentos, aunque también pueden ser cancerígenas. En algunos pasos de la reacción se forman pirazinas, quinoxalinas y pirido[3,4-d]imidazoles, que están involucrados en la formación de las AHs.

La reacción de Maillard en los alimentos se inicia con la reacción entre los grupos amino de proteínas, péptidos o aminoácidos libres con los grupos carbonilo de azúcares reductores (glucosa, fructosa, etc.). Esta reacción se acelera con la temperatura de cocción y está influenciada por varios factores, tales como el pH, el tiempo de cocción, la presión, etc.; además, puede catalizarse con la presencia de algunos metales. Por lo tanto, la variación de cualquiera de estos factores altera la velocidad y los productos finales de la reacción.

En la Reacción de Maillard existen tres fases sucesivas:

- En la primera fase no existe producción de color. Se produce la unión entre los azúcares y los aminoácidos, que posteriormente se ha conocido como reestructuración de Amadori.
- En la segunda fase se produce la formación inicial de colores amarillos muy ligeros y de olores algo desagradables. En este paso se produce la deshidratación de azúcares,

formándose las reductonas o dehidrorreductonas, seguidas de una fragmentación. En el siguiente paso, conocido como degradación de Strecker, se generan compuestos reductores que facilitan la formación de los pigmentos.

- En la tercera fase se produce la formación de los conocidos pigmentos oscuros, denominados melanoidinas. El mecanismo no se conoce totalmente, pero se cree que implica la polimerización de muchos de los compuestos formados en la segunda fase.

En la Figura I.1.1 se muestra un esquema general de la reacción de Maillard.

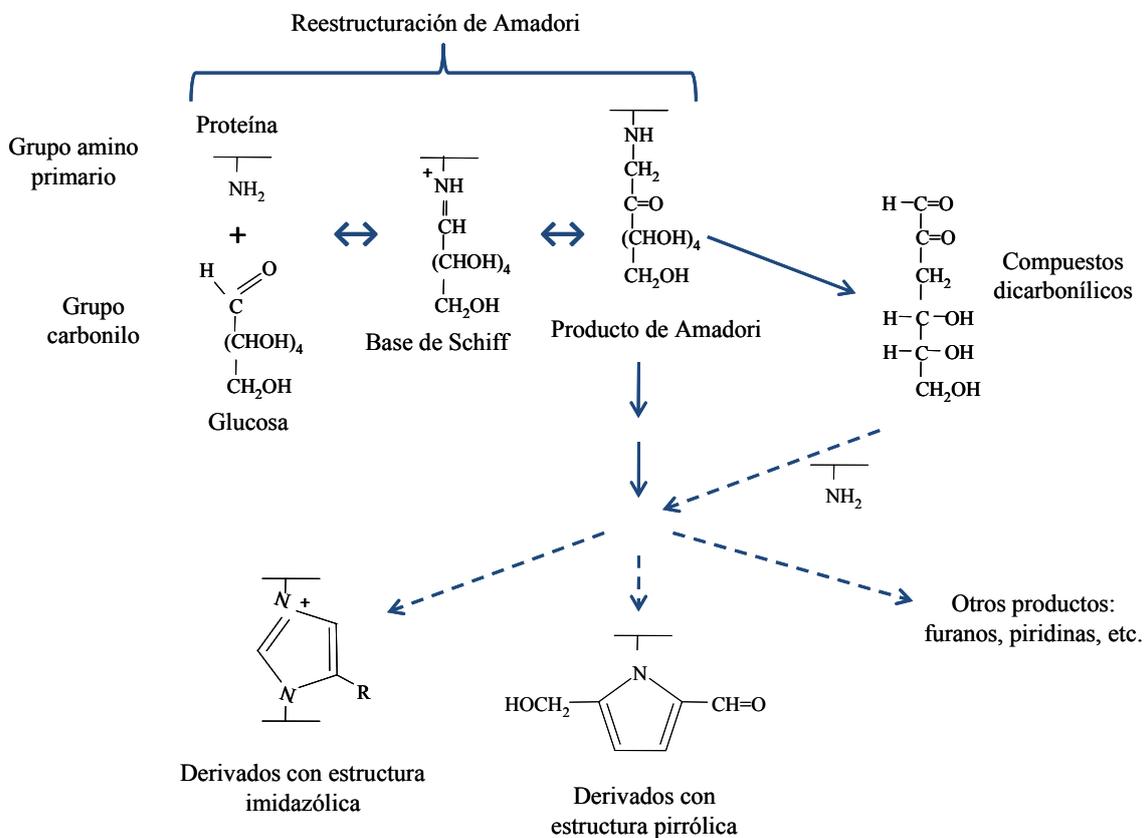


Figura I.1.1. Esquema general de la reacción de Maillard.

La formación de las AHs puede estudiarse en sistemas modelo [39]. La ventaja de estos modelos es la reducción de las reacciones secundarias de otros componentes de la carne, que no estén involucradas en la formación de las AHs. De hecho, al simplificar las matrices, algunas AHs fueron identificadas primero en los modelos y posteriormente encontradas en las muestras de carnes cocinadas. En cambio, en los sistemas alimentarios, donde se emplean las

muestras reales, las variables de reacción aumentan y tanto su estudio como la determinación de los productos adquieren mayor dificultad. El primer sistema modelo donde los compuestos mutagénicos fueron identificados consistía en una reacción de aminoácidos y proteínas. Las sustancias identificadas eran las mismas que las encontradas en las partes carbonizadas de las carnes y pescados asados [11].

Mecanismos de formación

Como se ha comentado anteriormente, los precursores de las AHs en carnes y pescados son la creatinina, creatina, hexosas, aminoácidos libres y algunos dipéptidos, compuestos que se encuentran normalmente en los músculos. De esta manera, se ha observado que cuando se calienta una mezcla de creatinina, glucosa, carnosita y una mezcla de aminoácidos, en proporciones similares a las que se encuentran en la carne de vacuno, se produce la formación de AHs polares y no polares [14, 40, 41]. Sin embargo, hasta la fecha todavía se desconocen en gran medida los mecanismos de formación de las AHs.

Algunos estudios han señalado que los productos de la reacción de Maillard, como las piridinas o pirazinas formadas por una degradación de Strecker, sufren una condensación tipo aldol. Las vinilpiridinas y vinilpirazinas resultantes sufren una adición-conjugación con creatinina. La reacción se completa con el cerrado del anillo, la eliminación de agua, dando lugar a las imidazoquinolinas, imidazoquinoxalinas e imidazopiridinas. Otro posible mecanismo propuesto para la formación de estas aminas involucra a los radicales libres intermedios, radicales carbono-carbono y radicales catión piridina y pirazina [42, 43]. La Figura I.1.2 muestra el mecanismo propuesto [44] para las aminas térmicas.

Otros estudios sugieren una condensación directa entre un aldehído y la creatinina. Las moléculas de creatinina formarían el anillo aminometilimidazo, típico de la mayoría de las AHs, y después se producirían la formación de ciclos y la eliminación de agua. La reacción sucede rápidamente si la temperatura es superior a 100°C. En la Figura I.1.3 se muestra el mecanismo de formación de la amina PhIP a partir de fenilalanina y creatinina [45].

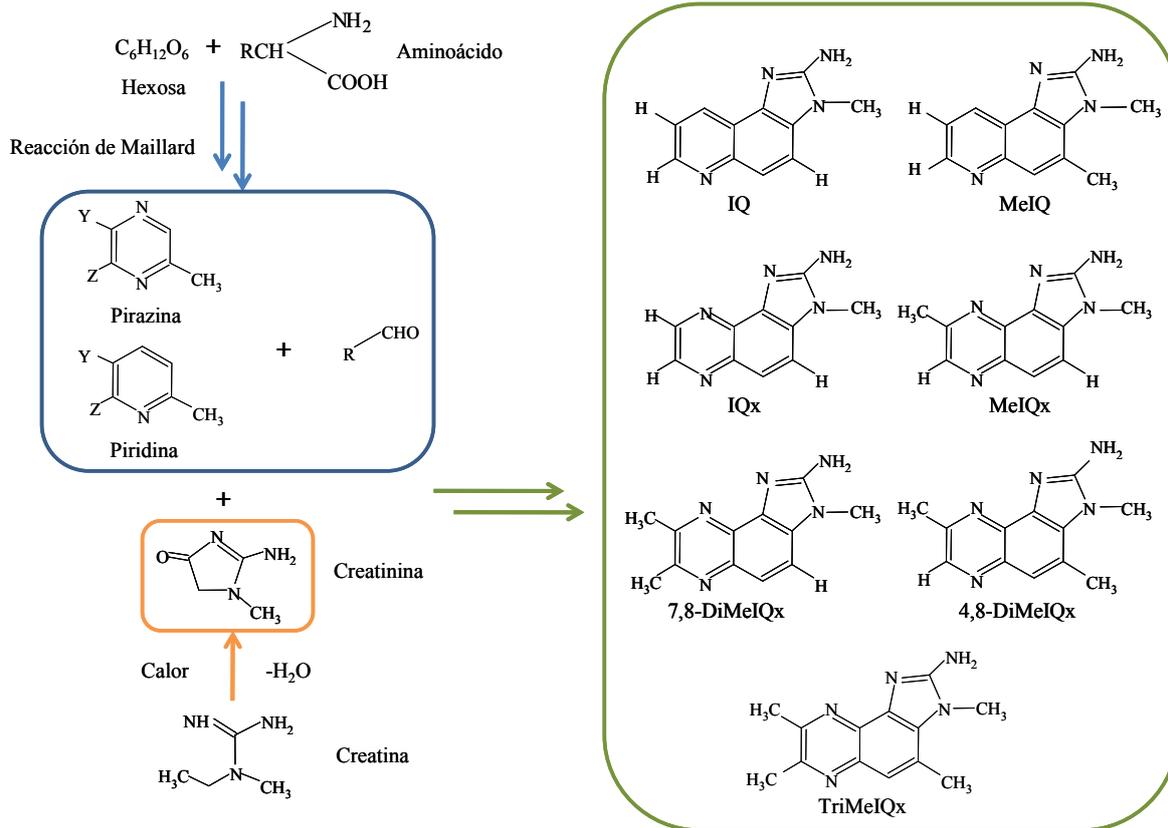


Figura I.1.2. Esquema del mecanismo de formación de las aminas quinolinas y quinoxalinas a partir de la reacción de Maillard.

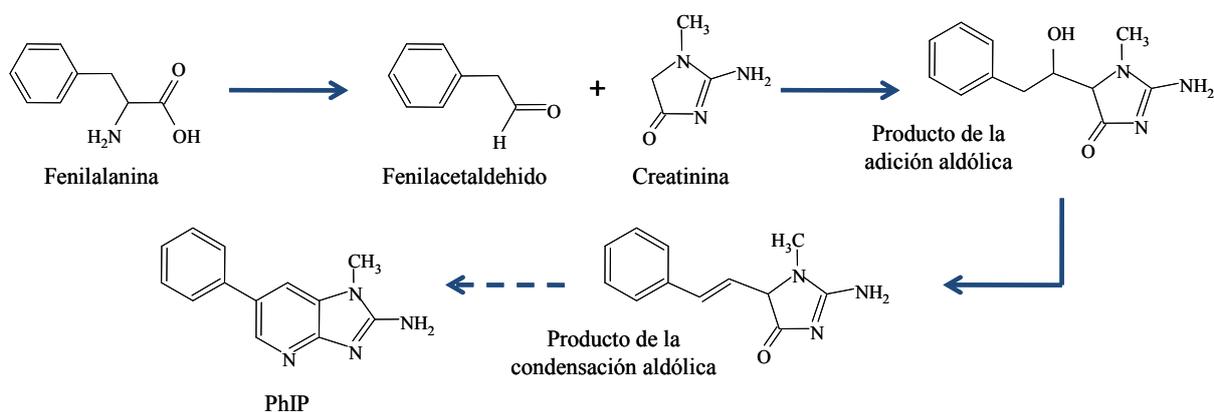


Figura I.1.3. Mecanismo de formación propuesto para la amina PhIP.

Uno de los mecanismos de formación sobre el que se tiene mayor información es el de la formación de las carbolinas. Tal y como se ha dicho anteriormente, las carbolinas pertenecen a la familia de las aminas pirolíticas, formándose a temperaturas superiores a 300°C por la pirolisis de aminoácidos y proteínas mediante una reacción radicalaria. En la Figura I.1.4 se muestra el mecanismo propuesto para la formación de dos β -carbolinas, NH y H [46].

La cinética de la formación de algunas AHs ha sido investigada en un sistema modelo con jugo de carne, obtenido presionando una muestra de carne asada [40], y en un sistema modelo preparado a partir de precursores (creatinina, carnosita, aminoácidos y glucosa), en proporciones similares a las que se encuentran en la carne de vacuno [14]. Las cinéticas de la formación y degradación, respectivamente, podrían describirse razonablemente mediante modelos de primer orden.

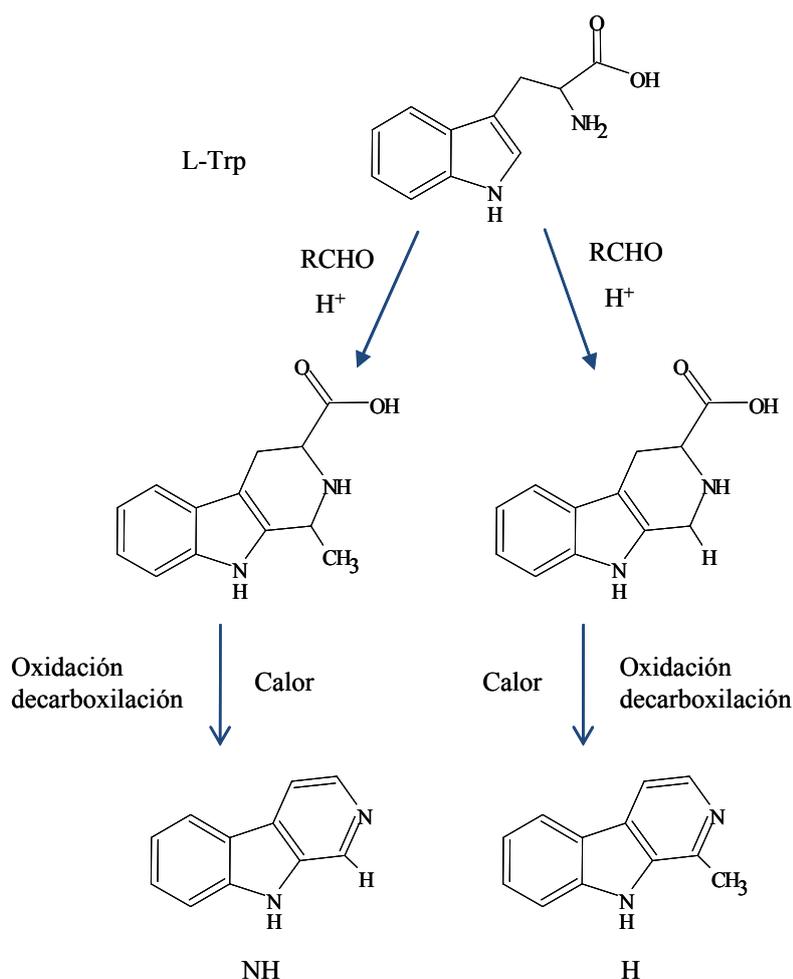


Figura I.1.4. Mecanismo de formación propuesto para NH yH.

De la misma manera que se han estudiado los mecanismos y la cinética de la formación de las AHs, se ha estudiado cinéticamente la estabilidad de algunas AHs durante el calentamiento a 100, 150 y 200°C para distintos períodos de tiempo [47]. Los resultados mostraron que durante el calentamiento de los alimentos se produce, no sólo la formación de las AHs, sino que también, si el tiempo y la temperatura son lo suficientemente altas, se produce una disminución de las mismas. PhIP es la amina más susceptible a la degradación durante el calentamiento, y esta inestabilidad puede atribuirse a las siguientes razones: a) PhIP contienen más dobles enlaces conjugados carbono-carbono, lo cual la hace más susceptible a cambios químicos que otras AHs, y b) PhIP contiene un anillo bencénico unido a un enlace simple de una cadena lateral, lo que le hace libre para rotar [47].

1.1.2 Factores que afectan la formación de Aminas Heterocíclicas en alimentos

Se han estudiado extensivamente los factores que favorecen la generación de aminas mutagénicas durante el procesado térmico de la carne y el pescado. Las variables físicas como la temperatura, tiempo y método de cocción afectan significativamente a la actividad mutagénica de las muestras cocinadas. Se ha establecido que tanto las variedades como las cantidades de AHs aumentan con el incremento de la temperatura. Los contenidos de AHs específicas varían con el tipo de carne, método y grado de cocción. Otros factores dependientes del tipo de alimento son el pH, las cantidades de precursores, la presencia de ciertos iones divalentes, el contenido de sustancias que tienen efectos de favorecer o inhibir su formación, y el tipo de aminoácidos.

Temperatura y tiempo de cocción

La formación de las AHs depende en gran medida del tiempo y temperatura de cocción [48-68]. En alimentos cocinados a temperaturas inferiores a 150°C los niveles encontrados de AHs son bajos o no detectables, pero a temperaturas superiores la cantidad de aminas aumenta progresivamente a medida que aumenta la temperatura [69, 70], siendo este incremento no lineal para aminas como PhIP, A α C y las β -carbolinas [67, 71]. Las aminas NH y 4,8-DiMeIQx son más sensibles a los cambios de temperatura, al contrario que MeIQx y A α C [72].

Las AHs pirolíticas no se encuentran en carnes cocinadas a temperaturas inferiores de 200-225°C. A temperaturas más altas (>250°C), las concentraciones de los compuestos tipo IQ disminuyen en sistemas modelo [73, 74] y en muestras horneadas a 225°C no se encuentran las aminas A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 o Glu-P-2.

Sorprendentemente, con sólo 30 segundos de calentamiento se pueden llegar a formar cantidades detectables de AHs [75]. Para tiempos un poco mayores, y dependiendo de la temperatura de cocción, se alcanza un nivel máximo en la concentración de las AHs, después del cual la concentración se mantiene más o menos constante [76]. Algunos autores han demostrado que las cantidades de AHs y la actividad mutagénica disminuyen en sistemas modelo y en muestras de carne si aplicamos altas temperaturas y excesivos tiempos de cocción [70, 77].

Método de cocción

El método de cocción tiene una influencia considerable en la formación de la actividad mutagénica, ya que la temperatura utilizada y el mecanismo de transmisión de calor son muy diferentes [78-80].

Los tipos de cocinado que implican temperaturas alrededor de 100°C (hacer al vapor, escalfar, etc) no generan agentes mutagénicos o la cantidad es tan pequeña que no es cuantificable [51]. Otros tipos de cocción que calientan los alimentos mediante convección indirecta, como es el caso del horno convencional, producen niveles bajos de AHs.

La cocina con microondas se ha definido como una forma “suave” de tratamiento de los alimentos y la cantidad de AHs formadas es casi nula [81], probablemente debido a que el calor se genera en el interior del alimento y la superficie no alcanza temperaturas superiores a la de otras partes del alimento. Sin embargo, se ha encontrado que provoca la formación de las AHs tipo carbolinas [82]. Por otra parte, el pretratamiento con microondas antes de la cocción disminuye la formación de algunas AHs tipo IQ e IQx debido a que la grasa, el agua y los precursores de las AHs se reducen [81, 83].

Los métodos de cocción en los cuales la temperatura aplicada es elevada, como la fritura, el grill/barbacoa y el horneado, se consideran los mayores productores de AHs debido al contacto directo del alimento con la fuente de calor [84]. Además, durante la fritura, horneado o grill/barbacoa, hay una disminución en el contenido de agua desde el interior

hacia la parte exterior del alimento, y se produce la formación de una superficie relativamente seca, donde se concentran los precursores de las AHs.

Asar [85] produce menos AHs que freír [86] y cocinar en un horno de carbón [85]. Cuando se emplean hornos de convección a altas temperaturas y altas velocidades de aire se produce mayor nivel de mutágenos [80]. La temperatura del aire es el parámetro que más influye en la producción de AHs al cocinar al horno.

En todos los casos, para el mismo grado de cocción, se obtienen niveles diferentes de AHs para cada tipo de carne [84, 87-89]. Incluso con el mismo tipo de carne y grado de cocción, el lugar (restaurantes, restaurantes de comida rápida y casas particulares) o el método de cocción, pueden jugar un papel importante en el contenido de AHs [84, 87, 88].

La frecuencia y número de veces que se da la vuelta al alimento durante la cocción también han sido estudiados en relación a la formación de las AHs [56], encontrándose menores cantidades de AHs totales en muestras que eran dadas la vuelta cada minuto que en las que sólo se les daba la vuelta una vez.

El rebozado de los alimentos antes de freírlos es una práctica de cocción que a menudo se aplica a carnes y pescados. Se ha observado en muestras de algunos alimentos rebozados, que la actividad mutagénica es menor que cuando no se rebozan [80], probablemente debido a que el rebozado actúa como una capa aislante, disminuyendo la posible formación de AHs [90].

El adobar o marinar los alimentos con determinadas especias, como romero, mostaza, o zumo de limón entre otros muchos, antes de cocinarlos, reduce la formación de AHs. El efecto del adobado o marinado es atribuible a la presencia de compuestos antioxidantes, los cuales inhiben los procesos radicalarios [91].

Grado de cocción

El grado de cocción es un aspecto clave en la producción de AHs y está muy relacionado con el color oscuro de la superficie de los alimentos y el tiempo total de cocción [2, 84, 92, 93]. Las carnes poco cocinadas a temperaturas iguales o inferiores a 150°C muestran un contenido más bajo en mutágenos que las carnes muy cocinadas (a temperaturas superiores a 150°C) [93, 94]. La parte interna de la carne muestra un contenido menor en AHs que la superficie [94-96]. La formación de la corteza exterior al cocinar las carnes es el

resultado de un transporte continuo de agua y compuestos disueltos como aminoácidos y creatinina, a la superficie o cerca de la superficie de la carne, donde la temperatura es más alta.

Los resultados de los estudios muestran que no es posible estimar el contenido de las AHs sólo a partir de medidas del color de los alimentos cocinados. El color oscuro de los alimentos aumenta con la temperatura de cocción, pero no existe correlación con el contenido de AHs [50]. La relación entre el grado de cocción y el color de la superficie puede diferir debido a que algunas personas fríen la carne a una temperatura mayor durante un corto período de tiempo, para obtener una superficie oscura, mientras que el interior no esté cocinado. Así, es posible que se alcancen superficies con un grado de color similar sin aplicar una temperatura excesiva y esto evita la formación de mayores cantidades de AHs [51].

Tipo de carne

La cantidad de AHs generadas en diversos tipos de alimento es diferente aunque se hayan procesado de manera similar, lo que es debido a la diferente composición en aminoácidos, creatinina y proteínas, que son los precursores de las AHs.

Se han encontrado diferencias entre los músculos claros y oscuros en términos de precursores de las AHs. Los músculos claros contienen cantidades superiores de humedad, compuestos nitrogenados, aminoácidos libres totales y creatinina que los músculos oscuros. Los músculos oscuros contienen niveles más bajos de AHs, y esto puede deberse a su localización entre la piel y los músculos claros, evitando un contacto directo con la fuente de calor [97].

La carne de pollo se conoce como carne blanca, al contrario que la carne roja (carne de vacuno, cerdo, etc). En la carne de pollo, la principal diferencia es el contenido bajo en grasa, y los contenidos de aminoácidos, glucosa y creatinina [98]. Aminas como PhIP parecen formarse más fácilmente durante la cocción de carne de pollo que en carne de vacuno y cerdo o pescado, mientras que la cantidad de otras aminas, tales como MeIQx, son menores en pollo que en carne de vacuno o cerdo [4, 99, 100]

La cantidad de grasa desempeña un papel relevante, ya que hace más eficiente la transmisión del calor lo que provoca un aumento de la mutagenicidad [101]. Otro factor de influencia es el contenido en agua, ya que actúa como disolvente del medio de reacción. Sin

embargo, un exceso de agua provoca la dilución de los precursores y por tanto, dificulta la reacción.

Los jugos de las carnes contienen, frecuentemente, cantidades similares de AHs y similar actividad mutagénica que la carne por si misma. Por lo tanto, deben ser considerados como una fuente de compuestos mutagénicos en la dieta.

Los condimentos que simulan la carne, los extractos de carne y los restos de los recipientes se emplean en muchas ocasiones para preparar salsas. Los extractos se producen mediante la exposición de carnes crudas a un calentamiento prolongado a temperaturas más altas que las que se emplean normalmente en la cocción. En algunas ocasiones, los residuos de los recipientes en los que se ha cocinado la carne presentan niveles más altos de AHs [74, 90, 102]. Incluso en algunos alimentos, las AHs son detectadas solamente en estos residuos y no en los alimentos propiamente dichos.

Aceites y antioxidantes

Se ha descrito que la adición de aceites y antioxidantes puede favorecer o inhibir la formación de las AHs [85, 103]. Estos efectos opuestos dependen de distintos factores, como método y condiciones de cocción, factores tecnológicos, y variedad y concentración de antioxidantes.

Los compuestos fenólicos, particularmente aquellos procedentes del té y del aceite de oliva, parecen ser los inhibidores de la formación de las AHs más efectivos en sistemas modelo, aunque se observa una gran variabilidad debida a una dependencia con la concentración y a efectos pro- y anti-oxidantes. Los datos muestran que la protección frente a la formación de las AHs depende no sólo de la calidad y concentración de los antioxidantes, sino también de sus niveles relativos y de la influencia de otros constituyentes menores de los alimentos [104].

Las especias contienen antioxidantes que pueden desactivar radicales libres (pirazina y piridina) generados como intermedios durante la reacción de Maillard [105], pudiendo reducir la formación de las AHs durante el calentamiento. Todos los compuestos fenólicos investigados, aislados de las especias que se emplean normalmente, muestran fuertes efectos inhibidores en la formación de radicales libres de piridina, precursores en la formación de

algunas AHs. Además, se han detectado efectos antimutagénicos y anticancerígenos en estas especias [106].

Los efectos del ajo y algunos compuestos organosulfurados en la formación de AHs y de la mutagenicidad global también han sido evaluados [107, 108]. El ajo, el zumo de limón y la miel, son efectivos en la reducción de la formación de las AHs y la mutagenicidad global en las carnes adobadas o marinadas con estas sustancias [109].

El ácido ascórbico (vitamina C) en grandes cantidades reduce la formación de AHs, con la excepción de H [110]. Este comportamiento puede explicarse por la recogida de radicales libres y oxígeno [103].

Los carotenoides de los tomates también inhiben la formación de las AHs tipo IQx, tanto en sistemas modelo (creatinina, glucosa y glicina) como en sistemas con jugo de carne de vacuno [111].

La adición de aceite de oliva virgen inhibe la formación de los derivados IQx en sistemas modelo [112], posiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos inhibidores de la formación de radicales.

Otros antioxidantes estudiados con efectos inhibidores en la formación de las AHs son las proteínas de soja en los adobos o marinados empleados con muestras de carnes y pescados [113, 114].

Otros factores

La formación de AHs puede inhibirse al incorporar azúcares a los alimentos [110]. Este fenómeno puede explicarse teniendo en cuenta la reacción de Maillard. Los productos de esta reacción se forman más rápidamente a altos niveles de azúcar. Éstos a su vez reaccionan con la creatinina o creatina, y de esta manera la cantidad de glucosa disminuye. A niveles más bajos de azúcar, la reacción no enzimática puede acelerarse debido a la formación de grandes cantidades de AHs. Sin embargo, a niveles altos de azúcar, los aminoácidos no pueden participar en la reacción de Maillard. En lugar de esto, puede suceder rápidamente la reacción de caramelización debido a la formación de un bajo rendimiento de AHs. Además, los productos de la reacción de Maillard pueden reaccionar con la sustancia mutagénica y dar lugar a una disminución en el contenido de las AHs [110].

Se ha descrito que aminoácidos como la prolina o el triptófano pueden competir en la reacción entre la creatinina y los precursores de las AHs. Asimismo, la fenilalanina es un precursor de la PhIP, y el triptófano ha sido confirmado como un importante precursor de las β -carbolinas, que se forman fácilmente a temperaturas normales de cocción [52]. Sin embargo, el triptófano no favorece la formación de α - o γ -carbolinas y PhIP, y favoreciendo en cambio la formación de los compuestos IQx [52].

El efecto del glutamato monosódico en la formación de las AHs no polares en pescado frito ha sido también estudiado [110]. La cantidad total de AHs aumenta al incrementar las cantidades de glutamato monosódico.

La presencia de cationes divalentes puede favorecer o inhibir la formación de AHs. Se ha observado que la adición de hierro incrementa la formación de MeIQx, mientras que las cantidades de H y NH disminuyen, y ni IQx ni PhIP son detectados. El hierro o la creatinina junto con el triptófano refuerzan la formación de NH y MeIQx más que cuando estos compuestos se añaden por separado [52]. El cobre no tiene efecto de refuerzo en el rendimiento de MeIQx [103]. Ambos cationes son catalizadores de la oxidación lipídica y se sugirió que el incremento en la formación de MeIQx por hierro podría ser debida a radicales libres formados vía oxidación lipídica catalizada por hierro. Por otra parte, la hidroquinona es un iniciador de las reacciones de radicales libres, y no afecta a la formación de MeIQx o IQx en los sistemas modelo, mientras que refuerza la cantidad de 7,8-DiMeIQx. Sin embargo, cuando la hidroquinona y FeSO₄ se añaden conjuntamente, se produce un marcado incremento en estas AHs. Probablemente el hierro oxida la hidroquinona a un radical que toma parte en una reacción cuyo mecanismo esté mediado por radicales libres [103]. Además, el Fe²⁺, en la forma de mioglobina, incrementa el contenido de AHs en la carne antes del calentamiento [105].

I.2 Toxicidad de las Aminas Heterocíclicas

I.2.1 Carcinogénesis de los alimentos

El proceso de oncogénesis es la mutación de una célula que, de esta forma, adquiere las características de las células tumorales, siendo una de las más importantes la capacidad de proliferar desordenadamente de forma irreversible. Se trata de un cambio estable que se transmite a las células descendientes de la célula mutada. Este proceso transcurre en varias etapas: la iniciación, progresión y proliferación, requiriendo la participación de varios oncogenes, durante varios años. Actualmente el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo.

La etiología del cáncer, es decir, sus causas, son numerosas, variadas y no totalmente conocidas en la actualidad. Existen causas endógenas, es decir, relacionadas con la herencia genética de los individuos, y causas exógenas, externas, entre las que se encuentran la polución ambiental, el tabaco, la dieta, algunas infecciones víricas, enfermedades precancerosas, etc. Se estima que el 95% de los cánceres más comunes están causados por factores ambientales y, de ellos, más de una tercera parte (entre el 30 y el 40%) están ligados a factores dietéticos como causa principal. Sólo una pequeña proporción de cánceres tiene un origen exclusivamente genético. Sin embargo, está demostrado que los factores genéticos pueden modificar el grado de asociación entre la dieta y cáncer, influyendo en la susceptibilidad individual.

La dieta parece implicada, en mayor o menor grado, con la aparición y el desarrollo de cánceres de: mama, colon, vejiga urinaria, próstata, esófago, estómago, pulmón, cuello del útero, endometrio, ovario, vesícula biliar, hígado y páncreas. Es una lista lo suficientemente larga, y algunos de los cánceres son tan importantes y frecuentes que hace necesario tener en consideración la alimentación de cada día.

La dieta es principalmente la mayor fuente de exposición humana a carcinógenos/mutágenos ambientales y anticarcinógenos/antimutágenos [115-120]. Ciertamente, juega un papel importante tanto en el aumento como en la reducción del riesgo de cáncer [117, 119, 121-124]. Constituye, por tanto, un vehículo de entrada en el organismo

de diferentes compuestos con capacidad para influir sobre el desarrollo del cáncer, algunos de ellos comportándose como carcinógenos y otros como anticarcinógenos. Dentro de los nutrientes que nos encontramos en la dieta, aquellos que podrían estar implicados con el cáncer son: la cantidad de calorías de la dieta, el contenido de grasas y fibra vegetal, el alcohol, el calcio, las vitaminas A, C y E, los β -carotenos, el ácido fólico, el selenio, las frutas y vegetales.

Carcinógenos en la dieta

Las sustancias carcinógenas pueden actuar ya sea induciendo lesiones mutagénicas en las células o bien actuando como promotores, estimulando el desarrollo del cáncer ya iniciado. Los carcinógenos pueden ser o no nutrientes, ya que en ocasiones están presentes en los alimentos pero carecen de valor nutritivo. Es el caso de algunos compuestos que se forman durante la manipulación de los alimentos, ya sea durante su conservación, cocinado, por sustancias producidas en la actividad industrial, o bien sustancias que se incorporan a los alimentos a través del aire o el agua. Otras veces se trata de tóxicos que acompañan habitualmente la dieta humana, como por ejemplo el alcohol.

Los estudios de laboratorio han identificado una gran variedad de mutágenos y carcinógenos dietéticos, entre los que destacan los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), AHs, nitrosaminas, micotoxinas y una sorprendente variedad de carcinógenos que se encuentran de manera natural en las plantas [115-120, 125]. Debido a la presencia de muchos mutágenos y carcinógenos en la dieta, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos, que en contra de lo esperado, solamente han podido identificar consistentemente unos pocos componentes dietéticos que incrementarían el riesgo de cáncer [126]. En la Tabla I.2.1 se muestran algunos de los carcinógenos/mutágenos que se encuentran en la dieta.

Anticancerígenos en la dieta

Los estudios de laboratorio han identificado un gran número de antimutágenos y anticancerígenos dietéticos, la mayoría de los cuales están presentes en las plantas [127]. En la Tabla I.2.1 se muestran algunos de los anticancerígenos presentes en la dieta.

Los mecanismos por los cuales estos compuestos presentan actividad anticancerígena/antimutagénica son principalmente la inactivación directa de los

carcinógenos/mutágenos, la modulación enzimática y la antioxidación [127]. La restricción del consumo calórico en la dieta ha demostrado ser un anticancerígeno en experimentos realizados con animales [127].

Tabla I.2.1. Componentes de la dieta con efecto carcinógeno y anticarcinógeno.

Carcinógenos	Anticarcinógenos
Naturales:	Nutrientes:
Nitratos	Ácido fólico
Teobromina	Vitamina C
Hidrácinas	β-caroteno
Alcaloides	Vitamina E
Cafeína	Selenio
Micotoxinas:	Fibra
Aflatoxinas de los hongos	No nutrientes:
Aflatoxina B1	Fitoestrógenos
Compuestos N-nitrosos:	Flavonoides
Nitrosamidas	Isocianatos de índoles
Nitrosaminas	Alisulfuros
Hidrocarburos aromáticos policíclicos:	Inhibidores de las proteasas
Contaminación ambiental	Polifenoles
Preparación culinaria	
Aminas heterocíclicas:	
Preparación culinaria	
Grasa:	
Aumento de radicales libres	

La ingesta elevada de frutas y verduras, y por lo tanto un consumo elevado de vitaminas, antioxidantes y carotenoides, se ha asociado con una disminución del riesgo de padecer cáncer, relación que es especialmente relevante para el cáncer de pulmón, gástrico y colorrectal, entre otros.

Aún y siendo bien conocidas las propiedades beneficiosas de determinados nutrientes, los estudios no siempre han podido demostrar sus efectos protectores. En este sentido, no puede hablarse de nutrientes clave sino más bien de todo un conjunto de nutrientes con capacidad para interferir a diferentes niveles en el complejo proceso de la carcinogénesis.

I.2.2 Importancia de las Aminas Heterocíclicas en la salud humana

Con el fin de predecir la carcinogenicidad de las AHs en humanos, se han desarrollado modelos de laboratorio que incluyen test de mutagenicidad. Entre ellos el más ampliamente utilizado ha sido el test de Ames. En la Tabla I.2.2 se indica la potencia mutagénica de las AHs con un sistema metabólico S9 y dos tipos de *Salmonella typhimurium*, una sensible a las mutaciones de eliminación (TA98) y otra a las de sustitución (TA100).

En la Tabla I.2.2 se puede observar que las AHs tienen mayor respuesta en el sistema TA98, y que la mutagenicidad específica de algunas de ellas es considerablemente superior a la de algunos mutágenos/carcinógenos, como la Aflatoxina B1 y el Benzo[a]pireno. Varios estudios han puesto de manifiesto que la potencia mutagénica de las AHs está relacionada con factores estructurales, como la extensión del sistema aromático y el número y posición de los sustituyentes [128, 129].

A pesar de la simplicidad del test de Ames y de la demostrada correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad, no todas las sustancias que provocan mutaciones dan lugar a un proceso tumoral. Es por ello que muchos científicos han realizado ensayos de carcinogenicidad a largo plazo con animales [130, 131]. Así, diversas aminas han dado resultados positivos en varios órganos, tal como se recoge en la Tabla I.2.3. Sin embargo, las elevadas dosis a las que se administran los mutágenos y el diferente metabolismo en animales y humanos, provocan ciertas dudas sobre los resultados obtenidos de los experimentos a largo plazo *in-vivo*.

Tabla I.2.2. Mutagenicidades de las AHs y algunos carcinógenos típicos expresadas como *Revertants* μg^{-1} en dos especies de *Salmonella typhimurium*.

Compuesto	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
	TA98	TA100
MeIQ	661000	30000
IQ	433000	7000
4,8-DiMeIQx	183000	8000
7,8-DiMeIQx	163000	9900
MeIQx	145000	14000
Trp-P-2	104000	1800
4-CH ₂ OH-8-MeIQx	99000	3000
IQx	75000	1500
Orn-P-1	56800	-
Glu-P-1	49000	3200
Trp-P-1	39000	1700
Cre-P-1	19000	400
Glu-P-2	1900	1200
PhIP	1800	120
7,9-DiMeIQx	540	-
A α C	300	20
MeA α C	200	120
Phe-P-1	41	23
4'-OH-PhIP	2	-
Aflatoxina B1	6000	28000
4-Nitroquinolina 1-oxido	970	9900
Benzo[a]pireno	320	660

Tabla I.2.3. Carcinogenicidad de las AHs en ratas (A) y ratones (B) [132].

AHs térmicas		Dosis en la dieta (%)	Órganos diana	Potencia TD₅₀ (mg/kg/día)
IQ	A	0.03	Hígado, intestino, piel, glándula Zymbal, clítoris	0.7
	B	0.03	Hígado, estómago, pulmón	14.7
MeIQ	A	0.03	Intestino, piel, boca, glándula mamaria, glándula Zymbal	0.1
	B	0.04, 0.01	Hígado, estómago	8.4
MeIQx	A	0.04	Hígado, cítoris, glándula Zymbal, piel	0.7
	B	0.06	Hígado, pulmón, sistema circulatorio	11.0
PhIP	A	0.04	Intestino, glándula mamaria	0.9
	B	0.04	Tejido linfático	31.3
AHs pirolíticas		Dosis en la dieta (%)	Órganos diana	Potencia TD₅₀ (mg/kg/día)
Trp-P-1	A	0.015	Hígado	0.1
	B	0.02	Hígado	8.8
Trp-P-2	A	0.01	Hígado, vejiga urinaria	-
	B	0.02	Hígado	2.7
Glu-P-1	A	0.05	Hígado, intestino, clítoris, glándula Zymbal.	0.8
	B	0.05	Hígado, sistema circulatorio	2.7
Glu-P-2	A	0.05	Hígado, intestino, clítoris, glándula Zymbal	5.7
	B	0.05	Hígado, sistema circulatorio	4.9
AαC	B	0.08	-	15.8
MeAαC	A	0.02, 0.01	Hígado	6.4
	B	0.08	Hígado, sistema circulatorio	5.8

TD₅₀: dosis diaria administrada a lo largo de toda la vida del animal que induce tumores en un 50% de la población.

1.2.3 Estudios epidemiológicos

Se han llevado a cabo algunos estudios epidemiológicos para probar la hipótesis de que existe una asociación entre el consumo de carne y el cáncer en humanos [12, 51]. En prácticamente todos los estudios es difícil unir el consumo de carne con la ingesta de AHs. No pueden excluirse otras sustancias y factores que contribuyen a la etiología de estos cánceres, por ejemplo, las nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), archilamida, alto consumo de grasas y sal, actividad física y otros [51, 79, 133-137].

En cualquier caso, los estudios epidemiológicos evidencian que un alto consumo de carnes rojas muy hechas puede inducir ciertos tipos de cáncer [138-141].

Expertos de la Fundación Mundial para la Investigación del Cáncer (WCR) y el Instituto Americano para la Investigación del Cáncer (IARC) [9], revisaron los datos disponibles sobre el consumo de carne roja y el riesgo de cáncer [139]. Solamente se pudo concluir que un alto consumo de carne roja probablemente incrementa el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal, y posiblemente incrementa el riesgo de cáncer de páncreas, mama, próstata y riñón.

Esto sugiere que no hay evidencias científicas suficientes para probar que estos compuestos genotóxicos realmente son la causa del cáncer y, por lo tanto, no se han fijado límites para su presencia en los alimentos cocinados. No obstante, las autoridades competentes de la mayoría de los países occidentales recomiendan minimizar su presencia. Las razones son la coexistencia de otros mutágenos/carcinógenos en los alimentos, y la posibilidad de que las AHs inducen mutaciones, incrementando así la sensibilidad a los promotores de los tumores.

El mayor problema de los estudios epidemiológicos es obtener una estimación correcta para la exposición a las AHs [142-145]. Se ha de tener en cuenta tanto la valoración dietética como los datos analíticos de los niveles de las AHs en los alimentos. En este sentido, se utilizan encuestas sobre la frecuencia en la cual se consumen los alimentos, el tipo y la cantidad de comida ingerida. Además hay que incluir los métodos y grados de cocción, pudiéndose producir fallos debidos a la dificultad en la cuantificación del grado de cocción y a la variación diaria de la dieta. Además, las AHs presentes en los alimentos son muy numerosas y la cuantificación de cada una de ellas en un gran número y variedad de muestras

de alimentos no es una tarea fácil. Teniendo en cuenta estos aspectos, no es sorprendente que los datos bibliográficos sean muy incompletos [146].

Además, cuando se emplean los datos de la bibliografía sobre los contenidos de las AHs en los platos cocinados, se encuentra que muchos experimentos se han llevado a cabo en unas condiciones de cocción que no están especificadas, o empleando altas temperaturas y tiempos de cocción para maximizar la formación de las AHs. Esto da lugar a que los resultados no se puedan asociar con formas representativas de cocinar la carne en la población de un país.

Por tanto, es importante establecer bases de datos del contenido de las AHs en alimentos cocinados que sean representativos de los hábitos alimenticios de la población que está siendo estudiada y teniendo en cuenta cada ingrediente de la receta, especias, condimentos, etc. Los platos deberían prepararse de manera que refleje las formas en la que se cocinan normalmente tanto en las casas particulares como en los restaurantes.

Para solucionar estos problemas relacionados con el uso de los cuestionarios en el estudio de la exposición de las AHs, se han realizado algunos esfuerzos en el desarrollo de biomarcadores. Los biomarcadores de la dieta prometen suministrar medidas más fiables sobre el consumo dietético. Son más objetivos porque no dependen de las entrevistas realizadas.

Las AHs no se acumulan en los tejidos corporales y, por lo tanto, la medida de las AHs en los fluidos corporales solamente se podría realizar en exposiciones recientes [147]. Sin embargo, puede ser posible estudiar el papel de las AHs en la salud humana mediante medidas de sus uniones con el ADN, debido a que las AHs u otros metabolitos son capaces de formar aductos con el ADN. Además, la medida de los aductos de ADN permitiría conocer los niveles de exposición, absorción, metabolismo e interacciones con el ADN de las AHs. Las tecnologías más recientes utilizando biomarcadores de largo tiempo como los aductos de ADN, de proteínas y hemoglobina deben desarrollarse en el futuro. Además, estos biomarcadores reflejarán el consumo en semanas o meses y serán necesarios por lo tanto en estudios epidemiológicos [66].

Como conclusiones podemos decir que los estudios epidemiológicos sobre cáncer y nutrición han aportado sólidas pruebas de que algunos patrones dietéticos, características antropométricas y la actividad física juegan un importante papel en la etiología de alguno de los cánceres más frecuentes. Un mejor conocimiento de los alimentos podría ayudar a orientar

cambios futuros con el propósito de reducir el riesgo de cáncer. Actualmente, las recomendaciones de salud pública promueven el alto consumo de frutas y verduras, y aconsejan moderación en el consumo de alcohol, de carne y de alimentos ricos en sal. Si bien estas recomendaciones son totalmente justificadas en el estado actual de conocimientos, algunos estudios recientes indican que la relación entre nutrición y cáncer puede ser mucho más compleja, e incluye otros factores, más allá de la simple composición de la dieta.

I.3 Metabolismo de las Aminas Heterocíclicas

I.3.1 Aspectos metabólicos de las AHs y su posible implicación en el riesgo de desarrollo del cáncer

La activación metabólica de las AHs está catalizada por enzimas polimórficas, lo que da lugar a diferencias significativas en el riesgo de cáncer entre los individuos [148]. Sin embargo, la variación genética en la población humana no es el factor exclusivo que juega un papel en el riesgo eventual del cáncer. La preparación de los alimentos determina la cantidad y el tipo de AHs que se ingieren, y el consumo de las AHs varía ampliamente de un día a otro debido a las preferencias dietéticas y a los métodos de cocción [149].

El metabolismo y la bioquímica de las AHs han sido recientemente revisados [150], pero hay que destacar que, para la mayoría de ellas, el metabolismo aún no se conoce completamente. Un diagrama representativo del metabolismo de las AHs se muestra en la Figura I.3.1.

En general, el metabolismo de las AHs puede resumirse en los siguientes pasos: la principal ruta para la activación metabólica de las AHs empieza con la N-hidroxicación del grupo amino exocíclico, catalizada principalmente por el citocromo P450 1A 2 (CYP1A2). Aunque estos metabolitos pueden reaccionar directamente con el ADN, el paso de N-hidroxicación está seguido normalmente de procesos de sulfación o acetilación por medio de la sulfotransferasa 1A1 (SULT1A1) o N-acetiltransferasas (NAT), respectivamente.

Los genes NAT1 y NAT2 codifican las enzimas NAT. NAT2 está involucrado tanto en la N-acetilación de las AHs como en la O-acetilación de los N-hidroxicatos derivados. En general, la N-acetilación es un mecanismo de detoxificación mientras que la O-acetilación normalmente es un paso de activación. El fenotipo distingue entre individuos N-oxidantes y O-acetiladores “rápidos” y “lentos”. Estos ésteres activados son electrófilos capaces de reaccionar con ADN, proteínas y otros constituyentes celulares para formar aductos. Los productos resultantes pueden ser inestables y degradarse espontáneamente. Algunos de los metabolitos producidos pueden ser conjugados por mecanismos de sulfación y glucoronidación por medio del glutatión S-transferasa y UDP-glucuronosiltransferasa,

respectivamente. Los compuestos polares formados proceden del glutatión *S*-transferasa y se excretan rápidamente a través de la bilis u orina. Pueden ser también transportados a tejidos extrahepáticos donde puede ocurrir un metabolismo posterior. Los compuestos polares formados a partir de la UDP-glucoronosiltransferasa no son reactivos y se excretan por la orina.

Por otra parte, muchos genes codificados para las enzimas de biotransformación como la CYP1A2 y NAT2 exhiben una distribución polimórfica en la población humana. Estas actividades enzimáticas son por lo tanto responsables de las variaciones entre individuos, dando lugar a perfiles característicos de capacidades metabolizantes para cada persona [149]. De esta manera, hay algunos genes comunes polimorfos en el citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6), glutatión *S*-transferasas (GSTM1, GSTP1 y GSTT1), sulfotransferasas (SULT1A1 y SULT1A2) y *N*-acetiltransferasas (NAT1 y NAT2), entre otros.

Citocromo P450. El gen más importante es el CYP1A2. Se ha demostrado que las carnes que contienen altos niveles de AHs pero bajos niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos inducen la actividad del CYP1A2 [66]. De hecho, la actividad del CYP1A2 aumenta en la mayoría de los sujetos después de consumir altas cantidades de carnes cocinadas a altas temperaturas, lo que sugiere una inducción causada por algunos compuestos formados durante la cocción a dichas temperaturas [66]. Considerando el proceso de excreción de las AHs, el CYP1A2 determina principalmente las cantidades de las aminas no metabolizadas, y esta cantidad refleja una exposición reciente de las AHs procedentes de la dieta [142, 149, 151].

Sulfotransferasas. El gen SULT1A1 es capaz de activar las AHs, HAPs y otras aminas aromáticas para formar especies que pueden unirse al ADN. Esta actividad está sustancialmente reducida a las enzimas codificadas por la baja actividad de la variación del alelo SULT1A1*2/*2. Este genotipo es menos frecuente en africanos-americanos que en caucasianos [141]. Conjuntamente con esta variabilidad genética, debería destacarse que muchos compuestos encontrados en frutas y verduras inhiben la actividad de las sulfotransferasas.

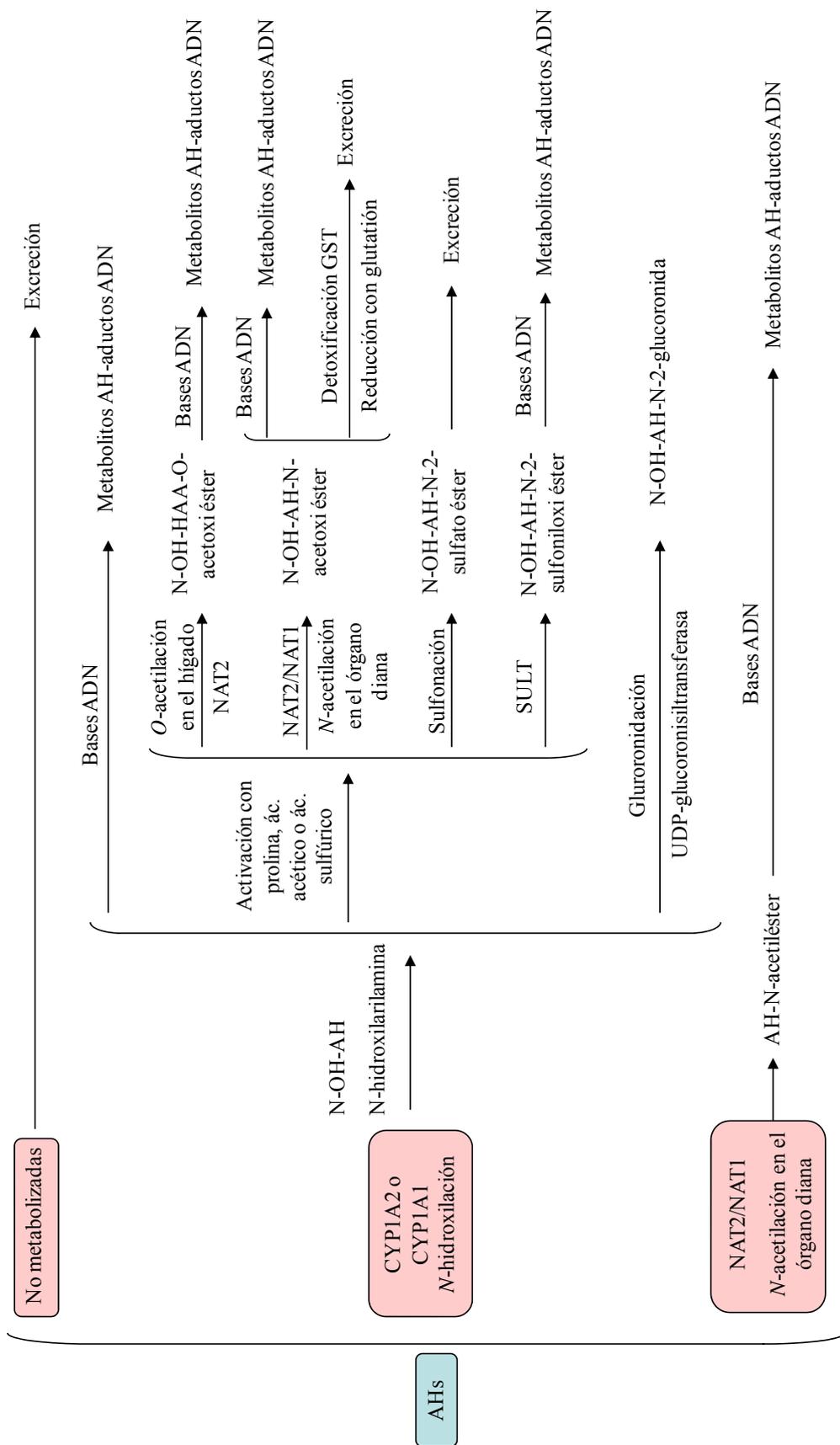


Figura I.3.1. Metabolismo general de las Aminas Heterocíclicas.

N-Acetiltransferasas. Tanto NAT1 como NAT2 son altamente polimórficos en humanos, y se han identificado aproximadamente 40 alelos. La actividad de NAT2 no puede ser alterada por factores ambientales como los componentes de la dieta. Los sujetos pueden designarse como acetiladores “lentos”, “intermedios” o “rápidos”, dependiendo de su habilidad para acetilar muchas clases diferentes de sustratos, incluidas las AHs [149]. El genotipo NAT1 está unido a una elevada actividad de la enzima. Sin embargo, las AHs han demostrado ser sustratos pobres para la NAT2, el genotipo acetilador más rápido. Asimismo, el gen UDP-glucuronosiltransferasa1A7 (UGT1A7) es polimórfico y codifica una enzima involucrada en la detoxificación de las AHs y HAPs.

Glutación-S-Transferasa. La sulfación y la acetilación son rutas de activación para las AHs. No obstante, existen muchas rutas de detoxificación, incluyendo la reducción de los metabolitos electrófilos reactivos de las AHs con glutación. La GSTA1 humana parece ser la GST más efectiva para la detoxificación del metabolito reactivo de PhIP [141].

I.4 Niveles de las Aminas Heterocíclicas en alimentos

Los primeros datos cuantitativos de la presencia de AHs en alimentos fueron publicados a principios de las década de los 80. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios encaminados a la determinación de las concentraciones de estos mutágenos. En algunas publicaciones, se pueden encontrar varias recopilaciones de los contenidos de AHs en alimentos [99, 152-156]. Todas las AHs conocidas excepto TriMeIQx, LYs-P-1, Orn-P-1 y Cre-P-1 han sido detectadas a diferentes niveles en varios tipos de alimentos. Dada la gran variabilidad tanto de las características del alimento procesado como de la metodología culinaria utilizada, las concentraciones de las AHs descritas en la bibliografía abarcan un amplio intervalo de valores. En general, el compuesto más abundante es la PhIP. En los demás casos, las aminas encontradas más frecuentemente y en mayor cantidad dependen del tipo de alimento. Así, en la ternera las AHs que se encuentran en mayor concentración son $\text{PhIP} > \text{A}\alpha\text{C} > \text{MeIQx} > \text{IQ}$, mientras que en el caso del cerdo, destacan la presencia de PhIP y MeIQx, aunque también la 4,8-DiMeIQx y el comutágeno H están presentes. En el pollo, la PhIP se forma a niveles considerables, seguido de cantidades respetables de MeIQx y A α C. En pescados se encuentran sobretodo $\text{H} > \text{A}\alpha\text{C} > \text{IQ} > \text{PhIP}$.

En las Tablas I.4.1 y I.4.2 se muestran los contenidos de AHs presentes en los tipos de alimentos considerados en el desarrollo de esta Tesis: extractos de carne, concentrados de caldo (pastillas de caldo) y alimentos cárnicos infantiles (potitos).

Tabla I.4.1. Contenidos de algunas AHs pirolíticas (ng g⁻¹) en extractos de carne, concentrados de caldo y potitos.

Extractos de carne							
Glu-P-1	H	NH	Trp-P-2	Trp-P-1	AαC	MeAαC	Ref.
			< 8.1	1.6 - 4.0	< 6.4	0.3 - 5.0	[156]
8 ± 1	135 ± 12	61±7	< 0.1	< 0.2	< 0.2	13 ± 2	[157]
10.1 ± 1.1	129.5 ± 16.8	74.0 ± 7.4	2.8 ± 0.4	< 0.4	< 0.8	< 0.4	[158]
			0.42 ± 0.03	< 0.03			[48]
	377	93.8					[159]
n.d.	110 ± 20	53 ± 17	2 ± 1	n.d.	14 ± 5	n.d.	[160]
15.54	n.c.	n.c.		n.c.	n.c.		[161]
Concentrados de caldo							
	300	210	n.d.				[52]
	n.c. - 0.2	n.c. - 0.4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[50]
	8.4 ± 2	8.0 ± 1.7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[50]
	4.6 ± 0.2	3.2 ± 2.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[50]
	3.3 - 21.9	7.9 - 22.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[162]
		43.2 ± 5	< 0.05	< 0.07	< 0.29	< 0.35	[22]
Potitos							
	19 ± 3	8.9 ± 0.3			n.d.		
	6.4 ± 0.8	6.3 ± 0.5			n.d.		
	11.1 ± 0.7	7.4 ± 0.3			n.d.		[21]
	10.7 ± 0.8	8.7 ± 0.3			n.d.		
	9.2 ± 0.6	5.4 ± 0.2			n.d.		

n.d.: no detectado

n.c.: no cuantificado

Tabla I.4.2. Contenidos de algunas AHs térmicas (ng g⁻¹) en extractos de carne, concentrados de caldo y potitos.

Extractos de carne							
PhIP	IQ	MeIQ	IQx	8-MeIQx	7,8-DiMeIQx	4,8-DiMeIQx	Ref.
10 ± 1	< 0.2	< 0.3	3.1 ± 0.2	< 1.1		< 0.2	[157]
< 0.4	< 0.2	< 0.2		< 1.0		< 1.4	[158]
1.8 ± 0.1	75.20 ± 0.23			37.8 ± 0.6		6.20 ± 0.28	[48]
n.c.	< 0.74	5.77		5.07		< 3.37	[161]
	9.59	n.d.		35.91			[163]
< 0.1				0.6		< 0.1	[164]
		10.4		9.3			[165]
< 0.73	< 0.20			< 0.05		< 0.14	[166]
Concentrados de caldo							
n.d.			n.d.	39			[52]
n.d.			2.1	29.0	n.d.	4.8	[167]
7.5			5.9	46.0	n.d.	6.2	[167]
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	[167]
n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.1	n.d.	n.d.	[50]
0.3				0.6		0.3	[164]
	< 0.1 - 0.7			0.2 - 1.0	< 0.14	< 0.74 - 2.8	[168]
< 0.1	< 0.1	< 0.1				< 0.1	[51]
< 0.12	< 0.09	0.5 ± 0.2	< 0.05	< 0.05	< 0.06	3.7 ± 0.7	[22]
Potitos							
	n.d.	n.d.					
	n.d.	n.d.					
	n.d.	n.d.					[21]
	n.d.	n.d.					
	n.d.	n.d.					

n.d.: no detectado

n.c.: no cuantificado

En la Figura I.4.1 se muestran los contenidos máximos, valores medios y desviaciones estándar de varias AHs pirolíticas en extractos de carne y concentrados de caldo. Se puede observar que los compuestos más abundantes son los comutágenos H y NH. Para estas dos aminas se observa una gran variabilidad con respecto a sus contenidos en diferentes muestras. A diferencia de los concentrados de caldo, en los extractos de carne se han encontrado, aunque a niveles inferiores, Trp-P-1, Trp-P-2 < AαC < MeAαC < Glu-P-1.

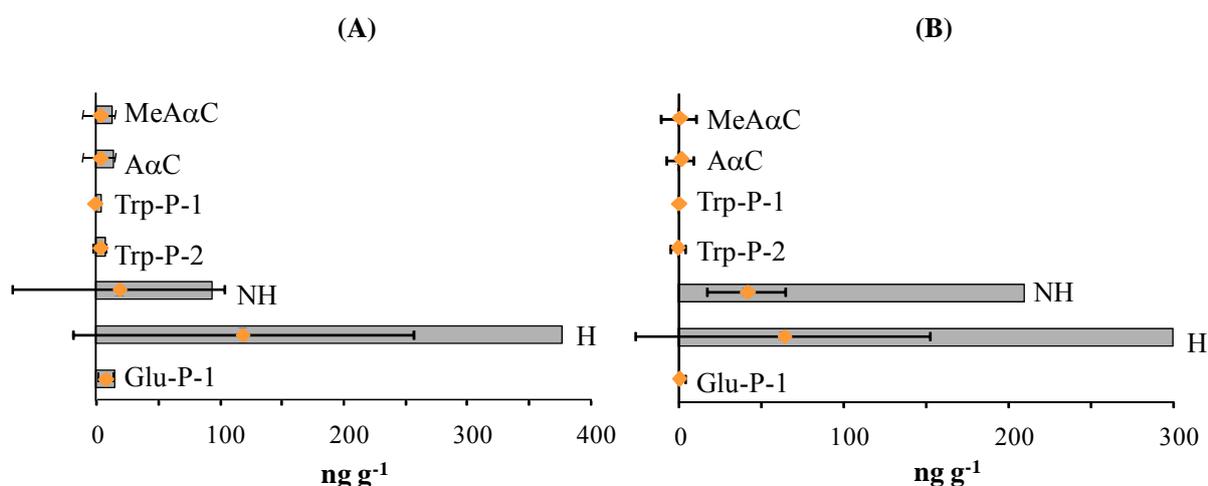


Figura I.4.1. Contenido máximo en ng g⁻¹ de algunas aminas pirolíticas en extractos de carne (A) y concentrados de caldo (B). Datos extraídos de la Tabla I.4.1

Respecto a las AHs térmicas, cuyos contenidos máximos, medios y desviaciones estándar se muestran en la Figura I.4.2 destaca la presencia de IQ en los extractos de carne y de 8-MeIQx en ambos tipos de muestras aunque en mayor concentración en los concentrados de caldo. Para estas aminas se observa una gran variabilidad en los contenidos en las distintas muestras. Otras aminas como PhIP y 4,8-DiMeIQx están presentes en ambas muestras en cantidades similares. Otros mutágenos como IQx y MeIQx también están presentes, siendo mayor el contenido de IQx en los concentrados de caldo, mientras que para los extractos de carne es la MeIQx.

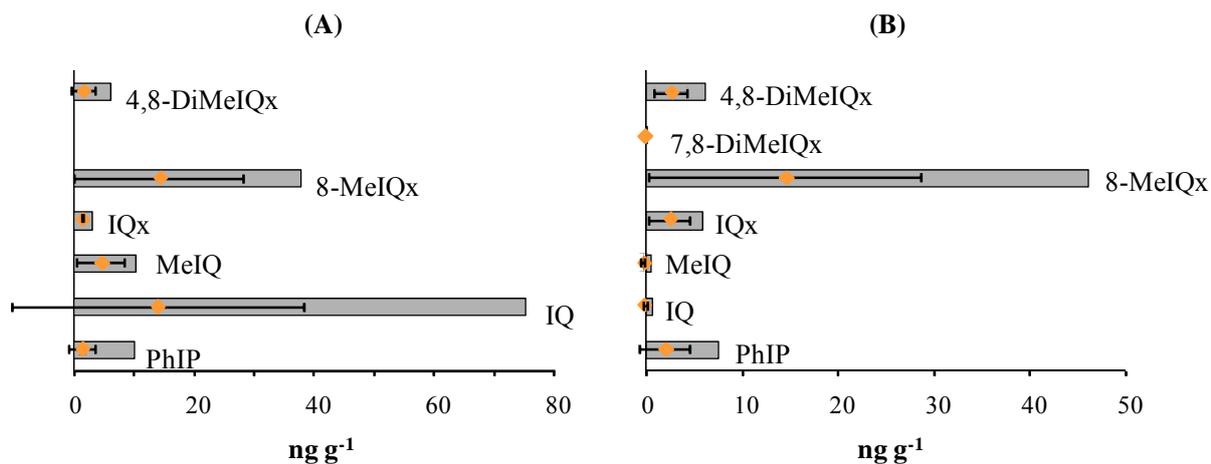


Figura I.4.2. Contenido máximo en ng g^{-1} de algunas aminas térmicas en extractos de carne (A) y concentrados de caldo (B). Datos extraídos de la Tabla I.4.2.

En el caso de los alimentos cárnicos infantiles, solamente se ha encontrado una referencia en la bibliografía en la que se determinen AHs en este tipo de muestras [21]. Se analizaron tanto AHs térmicas como pirolíticas en cinco tipos de muestras de alimentos infantiles: ternera, pollo, caballo, cordero y conejo, detectándose solamente los comutágneos NH y H, en concentraciones máximas de 8.9 y 19 ng g^{-1} , respectivamente.

I.5 Análisis de Aminas Heterocíclicas

Para establecer el papel de las AHs en la salud humana es necesario determinar, de forma precisa, las cantidades de estos compuestos presentes en la dieta. Esta información suele adquirirse a partir del conocimiento de los tipos y cantidades de alimentos consumidos, y de las concentraciones de las AHs en los mismos. De aquí la importancia de cuantificar estos compuestos en una variedad considerable de alimentos cocinados. Además, el desarrollo de procedimientos para el análisis cuantitativo de estos mutágenos es importante para estudiar los mecanismos de formación de estos compuestos bajo determinadas condiciones de cocción, útil en la prevención de su formación durante el procesado de los alimentos.

Por otra parte, la considerable complejidad de las matrices de los alimentos, las bajas cantidades en las que las AHs pueden estar presentes (ng g^{-1}) y la necesidad de introducir etapas sucesivas para conseguir selectividades adecuadas, justifica lo laborioso de los procedimientos analíticos disponibles. Todo ello hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas, tanto de tratamiento de muestra como de determinación.

Normalmente, los métodos que se emplean incluyen tediosos procedimientos de limpieza o *clean-up*, que conllevan pasos de extracción, purificación y preconcentración, seguidos de una técnica de separación, como la cromatografía líquida o de gas y la electroforesis capilar. Los principales sistemas de detección utilizados son Ultra-Violeta (UV), Fluorescencia, Electroquímico y Masas (MS). Realmente, los recientes avances en la instrumentación analítica, concretamente LC-MS y GC-MS, han facilitado enormemente la determinación de las AHs en alimentos.

I.5.1 Tratamiento de las muestras

La primera etapa en la preparación de muestras de alimentos para la determinación de AHs consiste normalmente en un paso de solubilización, donde la muestra se homogeneiza y se dispersa utilizando diferentes disolventes. Los disolventes utilizados son tanto orgánicos (acetona, acetato de etilo, metanol, mezclas agua-alcohol, entre otros) como disolventes acuosos (agua, ácido hidroclicórico, o más frecuentemente, hidróxido sódico, etc.). Después de

la solubilización, el siguiente paso se centra en eliminar las proteínas por precipitación, utilizando los procedimientos convencionales para llevar a cabo su separación por centrifugación o filtración. [8]. Una vez obtenido el extracto crudo que contiene las AHs, se lleva a cabo una etapa de purificación, en la cual se intenta eliminar el mayor número posible de interferencias. Finalmente la concentración de las AHs en el extracto limpio debe ser modificada para adecuarse a la técnica de análisis que se va a emplear.

Extracción Líquido-Líquido (LLE)

La LLE es la técnica más empleada para la extracción de analitos en muestras acuosas. El fundamento de esta técnica se basa en la distribución o reparto de la muestra entre dos fases inmiscibles en las cuales el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes.

Cuando se utiliza la LLE, como método para extraer las AHs desde la matriz de la muestra, se ha tener en cuenta el disolvente utilizado para homogeneizar las muestras. Cuando se ha empleado un disolvente orgánico, los analitos deben ser extraídos con HCl pero, en cambio, cuando se utiliza un disolvente acuoso, los analitos deben ser extraídos directamente con un disolvente orgánico, como diclorometano [25, 93, 164, 169-172], acetato de etilo [24, 164, 169, 172, 173], o dietiléter. Si la disolución obtenida es básica, las AHs deben extraerse con diclorometano en sus formas neutras [23, 166, 174]. Frecuentemente, es necesario llevar a cabo una purificación posterior mediante procesos de partición ácido-base consecutivos con diclorometano [93, 171, 175-177] o combinándolo con procesos de extracción con sólidos inertes como Kieselgur [170], Extrelut NT [65, 77, 105, 166, 172] o tierra de diatomeas. Estos materiales se pueden añadir a la disolución durante el proceso de extracción o ser utilizados como soportes en una columna cromatográfica. En la Tabla I.5.1 se recogen algunas de las metodologías de preparación de muestra basadas en la LLE para la determinación de aminas en extractos de carne.

Tabla I.5.1. Metodologías de preparación de muestras basadas en LLE y/o LC para la determinación de AHs en extractos de carne

Compuesto	Preparación de la muestra	Análisis	Referencia
IQ, MeIQx	<p><i>LLE como técnica de extracción y preconcentración</i></p> <ul style="list-style-type: none"> a) Acetona b) Filtrar, -15°C, diluir con HCl 0.01 M c) LLE: lavar con diclorometano (DCM) d) LLE: extraer con DCM a pH 12 e) Evaporar y disolver en dimetilsulfóxido (DMSO) 	GC-MS	[178]
IQ, MeIQx	<p><i>LLE y LC como técnica de purificación y preconcentración</i></p> <ul style="list-style-type: none"> a) Agua b) LC, blue cotton, filtrar y eluir con MeOH:NH₃ (50:1) c) Evaporar y disolver en HCl 0.1 M d) LLE: extraer con DCM e) Evaporar y disolver en MeOH:cloroformo (3:7) 	HPLC-Electroquímico	[179]
4,8-DiMeIQx	Igual que en la Ref. [179].	HPLC- Electroquímico HPLC-DAD	[180]
IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx	<p><i>LLE y LC como técnica de purificación y preconcentración</i></p> <ul style="list-style-type: none"> a) MeOH-Agua b) Centrifugar, ajustar a pH 8.5 c) LC, Amberlita XAD-2, eluir con acetona y metanol d) Evaporar y disolver en HCl a pH 2 e) LLE: extraer con acetato de etilo f) Evaporar y disolver en agua f) LC, blue cotton, eluir con MeOH:NH₃ (50:1) e) Evaporar y disolver en MeOH:Agua (1:1) 	LC-TSI-MS	[181]

Tabla I.5.1. Metodologías de preparación de muestras basadas en LLE y/o LC para la determinación de AHs en extractos de carne (cont.).

Compuesto	Preparación de la muestra	Análisis	Referencia
IQ, MeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2- Trp-P-1, Tr-P-2, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP	<p><i>LLE y LC como técnica de purificación y preconcentración</i></p> <p>a) NaOH 0.4 M b) LLE: Extrelut, eluir con DCM c) LLE: Extrare con HCl 0.1 M d) LLE: lavar con DCM e) LLE: ajustar a pH 11, extraer con DCM f) Evaporar y disolver en MeOH g) LC, Sephasorb HP, eluir con MeOH:NH₃ (9:1) h) Evaporar y disolver en MeOH</p>	HPLC-UV	[182]
IQ, MeIQ, MeIQx, TriMeIQx, Trp-P-1, Tr-P-2, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, AαC, H, NH	<p><i>LLE y LC como técnica de purificación y preconcentración</i></p> <p>a) NaOH 1 M b) LLE: Extrelut, eluir con DCM c) LC: CPC Sephasorb HP, eluir con DCM-MeOH-NH₃ d) Evaporar y disolver en MeOH-Agua e) LC, Sephasorb HP, eluir con MeOH:NH₃ (9:1) f) Evaporar y disolver en MeOH</p>	HPLC-DAD	[183]

Cromatografía Líquida en columna

La cromatografía líquida en columna (LC), dependiendo de las condiciones de elución, ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento de muestras para la determinación de AHs, tanto como técnica semipreparativa, para la separación de fracciones de los analitos previos a su determinación por HPLC, como para la purificación de los mismos. En la Tabla I.5.1 se recogen algunas de las metodologías de preparación de muestra basadas en la LLE-LC para la determinación de aminas en extractos de carne.

La Amberlita XAD-2, un adsorbente polimérico no iónico basado en poliestireno, fue uno de los primeros adsorbentes usados en LC para purificar las AHs. Después del correspondiente tratamiento, la fase acuosa se neutraliza y se pasa a través del adsorbente para concentrar los componentes relativamente no polares y ser posteriormente eluidos con acetona o acetona-metanol [94, 184].

Otros adsorbentes ampliamente utilizados han sido el “Blue Rayon” [185, 186], “Blue Cotton” [65, 105, 159, 169-172, 187-189] o “Blue Chitin” [190, 191].

“Blue Cotton” consiste en un algodón que está ligado covalentemente con tiosulfonato ftalocianina de cobre, que actúa como ligando. La adsorción tiene lugar en un medio acuoso, e incluye la formación de complejos 1:1 entre el ligando y los compuestos aromáticos. La desorción puede realizarse por elución con disolventes orgánicos, siendo la mezcla metanol-amoniaco el disolvente de desorción más eficiente.

Otro de los adsorbentes es el “Blue Rayon” que presenta algunas mejoras con respecto al “Blue Cotton” como material de soporte. El “Blue Rayon” lleva enlazado covalentemente un ligando de tiosulfonato ftalocianina de cobre, pero puede contener dos o tres veces más pigmento azul, dando lugar a un soporte más eficaz para la adsorción de las AHs [192]. El proceso de extracción utilizando “Blue Rayon” es el mismo que para “Blue Cotton” y ha sido utilizado principalmente para la adsorción de AHs presentes en aguas [193].

El empaquetamiento de columnas de extracción con “Blue Rayon” de manera estandarizada es difícil y, para solventar este inconveniente, surgieron las columnas pre-empaquetadas con “Blue Chitin” [190]. El chitin (poli-N-acetilglucosamina) también se puede unir covalentemente con el ligando tiosulfato ftalocianina de cobre. Al emplear un polvo de chitin como material de soporte, el contenido de pigmento azul puede ser dos veces superior que cuando se emplea rayon [194]. Los métodos basados en las columnas “Blue Chitin” son

más simples y más rápidos que los métodos basados en las columnas “Blue Cotton” o Blue “Rayon”, y permite obtener mayores recuperaciones para aquellas AHs con más de tres anillos en su estructura. En cambio, para el resto de las AHs las recuperaciones son bajas [190, 191, 194].

Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (SPE) puede considerarse como un caso especial de cromatografía líquida, donde la extracción de los analitos se lleva a cabo usando dispositivos comerciales que contienen entre 100 y 500 mg de un adsorbente sólido como fase estacionaria. Se basa en la retención sobre el adsorbente sólido de los compuestos deseados disueltos en una muestra líquida. La adición de un eluyente permite eliminar los componentes de la matriz que interfieren y, finalmente, los analitos se eluyen y concentran. Además, la sensibilidad y selectividad pueden optimizarse con el uso de diferentes adsorbentes y eluyentes y, en algunos casos, acoplando diferentes adsorbentes en tandem o acoplando en línea la LLE, usando tierra de diatomeas, con varios pasos de SPE

En el caso de la extracción de las AHs, la SPE ha sido ampliamente utilizada con diferentes tipos de adsorbentes tales como SepPak SI [74], Bond Elut SI [189], Isolute PRS [196] o acoplando tres cartuchos diferentes Isolute C₁₈/ Bond Elut SCX/ Bond Elut C₁₈ [197].

Tanto la sensibilidad como la selectividad analítica pueden optimizarse por combinación de diferentes adsorbentes y disolventes de elución, o por acoplamiento de diferentes adsorbentes en serie [41, 51, 55, 60, 65, 172, 198-208]. El hecho de unir varios pasos de extracción en fase sólida requiere pocas transferencias de muestra y pasos de evaporación. Otras ventajas son el ahorro de tiempo y las altas recuperaciones que se pueden alcanzar [2, 48, 168, 172, 198, 203]. En la Tabla I.5.2 se recogen algunas de las metodologías de preparación de muestra basadas en la LLE-SPE para la determinación de aminas en extractos de carne.

Tabla I.5.2. Metodologías de preparación de muestras basadas en LLE y SPE para la determinación de AHs en extractos de carne.

Compuesto	Preparación de la muestra	Análisis	Referencia
IQ, MeIQ, MeIQx, TriMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2	a) NaOH 1 M b) LLE: Extrelut, eluir con DCM c) SPE: Bond Elut PRS - Lavar con HCl 0.01 M y MeOH:HCl 0.1 M (6:4) - Eluir con AcONH ₄ 0.5 M, pH 8 d) SPE: Bond Elut C ₁₈ , eluir con MeOH:NH ₃ (9:1) e) Evaporar y disolver en MeOH	HPLC-DAD	[183]
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Glu-P-1	Igual que en la Ref. [183] lavando con MeOH:HCl 0.1 M (4:6)	HPLC-Electroquímico	[161]
IQ, MeIQ, MeIQx	Igual que en la Ref. [161].	HPLC- Electroquímico	[163]
MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-2, Glu-P-1	Igual que en la Ref. [161].	CZE-UV	[165]
IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Igual que en la Ref. [183] lavando con AcONH ₄ , pH 8.5	CZE-DAD	[166]
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, AαC, MeAαC, H, NH	a) NaOH 1 M b) LLE: Extrelut, eluir con DCM c) SPE: Bond Elut PRS - Acondicionar con HCl 0.1 M - Lavar con MeOH:H ₂ O (4:6) - Eluir con AcONH ₄ 0.5 M, pH 8 d) SPE: Bond Elut C ₁₈ , eluir con MeOH:NH ₃ (9:1) e) Evaporar y disolver en MeOH	HPLC-APCI-MS	[18]

Tabla I.5.2. Metodologías de preparación de muestras basadas en LLE y SPE para la determinación de AHs en extractos de carne (cont.).

Compuesto	Preparación de la muestra	Análisis	Referencia
Iso-IQ, MeIQ, NH, AαC, H, MeAαC, MeIQx, PhIP	a) 12 mL NaOH 1 M b) SPE: Kieselgur, eluir con 75 mL DCM c) SPE: SCX - Acondicionar con 7 mL DCM, 5 mL HCl 0.1 M, 10 mL H ₂ O y 5 mL MeOH - Lavar con 15 mL MeOH:H ₂ O (4:6) y 2 mL H ₂ O - Eluir con 20 mL AcONH ₄ 0.5 M, pH 8.5 d) SPE: C ₁₈ - Lavar con 5 mL H ₂ O - Eluir con 0.8 mL MeOH:NH ₃ (9:1)	CE-UV-DAD	[206]
IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, Trp-P-2, Trp-P-1, PhIP, AαC, MeAαC.	Igual que en la Ref. [183]	HPLC-Fluorescencia	[57]
DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, Trp-P-2, Trp-P-1, AαC, MeAαC.	a) 12 mL NaOH 1 M b) LLE: Tierra de diatomeas, eluir con 75 mL de acetato de etilo c) SPE: Bond Elut PRS c1) Fracción no polar: eluir con 6 mL HCl 0.01 M, 15 mL MeOH:HCl 0.1 M (6:4) y 2 mL H ₂ O. c2) Fracción polar: eluir con 20 mL AcONH ₄ 0.5 M. d) SPE: C ₁₈ - Lavar con H ₂ O - Eluir con MeOH:NH ₃ (9:1)	LC-ESI-MS LC-ESI-MS/MS LC-APCI-MS/MS LC-DAD	[209]

Tabla I.5.2. Metodologías de preparación de muestras basadas en LLE y SPE para la determinación de AHs en extractos de carne (cont.).

Compuesto	Preparación de la muestra	Análisis	Referencia
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, H, NH, A α C, MeA α C, Glu-P-1.	a) 10 mL NaOH 1 M b) LLE: Extrelut 20, eluir con 50 mL DCM c) SPE: Bond Elut PRS c1) Fracción no polar: eluir con 6 mL HCl 0.01 M, 15 mL MeOH:HCl 0.1 M (6:4) y 2 mL H ₂ O c2) Fracción polar: eluir con 20 mL AcONH ₄ 0.5 M, pH 8 d) SPE: C18 - Lavar con H ₂ O - Eluir con MeOH:NH ₃ (9:1): 1.4 mL fracción no polar y 0.8 mL fracción polar	LC-Fluorescencia- Electroquímico	[160]
IQ, PhIP, Trp-P-2, Trp-P-1, A α C, MeA α C, H, NH.	Igual que en la Ref. [160]	LC-MS	[210]
DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, NH, H.	Igual que en la Ref. [160]	LC-ESI	[204]
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, A α C, MeA α C, H, NH.	Igual que en la Ref. [183]	HPLC-Fluorescencia GC-MS	[162]
DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2.	Igual que en la Ref. [160]	GC-MS	[212]
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, MeA α C, H, NH.	a) NaOH 1 M y MeOH b) SPE: EN - Lavar con MeOH:NaOH 0.1 M (55:45), hexano, etanol:hexano (2:8), MeOH:NaOH (55:45) y hexano - Eluir con etanol:DCM (1:9)	LC-UV-DAD	[19]

Tabla I.5.2. Metodologías de preparación de muestras basadas en LLE y SPE para la determinación de AHs en extractos de carne (cont.).

Compuesto	Preparación de la muestra	Análisis	Referencia
IQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, 7,9-DiMeIQx.	a) NaOH 1 M b) LLE: Tierra de diatomeas, eluir con DCM c) SPE: PRS c1) Fracción no polar: eluir con HCl 0.1 M, MeOH:HCl 0.1 M (6:4) y H ₂ O. c2) Fracción polar: eluir con AcONH ₄ 0.5 M, pH 8 d) SPE: C ₁₈ - Lavar con H ₂ O - Eluir con MeOH:NH ₃ (9:1)	LC-MS/MS	[200]
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, AαC, MeAαC, H, NH, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-2, Trp-P-1.	Igual que en la Ref. [212] pero utilizando cartuchos PRS y C ₁₈ de varios tipos.	LC-MS	[202]
IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, DMIP, PhIP, AαC, MeAαC, H, NH, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-2, Trp-P-1.	Método A: Como Método D de la Ref. [212]. Método B: Como Método B de la Ref. [212].	LC-MS/MS	[86]
DMIP, IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, NH, H, Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC, MeAαC.	Igual que en la Ref. [212]	LC-MS	[205]
IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx	a) HCl 1 M. b) Alcalinizar con NaOH 6 M a pH 10.5 c) LLE: Tierra de diatomeas, eluir con DCM:tolueno (10:1) d) SPE: PRS - Lavar con HCl 0.1 M y H ₂ O - Eluir con MeOH:NH ₃ (9:1)	LC- Electroquímico	[168]

Hasta la fecha, el método tandem más popular es el propuesto por Gross y Grüter [77] en 1990. Este método se inicia con una homogeneización en medio alcalino de la muestra. A continuación, se lleva a cabo una LLE con diclorometano, utilizando tierra de diatomeas como soporte de la fase acuosa, y el extracto orgánico se transfiere a un cartucho de PRS, que es un intercambiador catiónico. A continuación, se lleva a cabo una activación del proceso de intercambio iónico haciendo pasar diferentes cantidades de ácido clorhídrico/metanol/agua. Seguidamente, los analitos se transfieren a un cartucho de C₁₈ acoplado en línea mediante el paso de acetato amónico a pH 8. Finalmente, las AHs se eluyen con metanol:amoníaco.

Una de las principales ventajas de esta técnica es que permite la elución de todos los compuestos fluorescentes en la misma fracción. Sin embargo, aunque el método funciona bien para muchos extractos de carne, no es adecuado para análisis de muestras más complejas [213, 167]. En este sentido, numerosos autores han dirigido sus esfuerzos con el objetivo de aumentar tanto la selectividad como la recuperación de los analitos. Para ello, se han llevado a cabo modificaciones en las disoluciones de lavado y de elución [50, 52, 100, 112, 201], así como la introducción de etapas adicionales de purificación con diferentes adsorbentes [213].

Entre los distintos procedimientos descritos en la bibliografía para la determinación de AHs en extractos de carne mediante la extracción en fase sólida, podemos destacar cuatro, todos ellos modificaciones del procedimiento de Gross [77], mostrados en la Figura I.5.1 y que se comentan brevemente a continuación.

Método A: Unos 2-3 gramos de muestra se alcalinizan con NaOH [212] y se procede a su homogeneización, agitando y ayudados de ultrasonidos, si es necesario. La disolución obtenida se mezcla con material de relleno Extrelut y se pasa a una columna que, a su vez, se acopla a otra rellena con PRS. Los analitos contenidos en la columna de Extrelut son eluidos con diclorometano e introducidos en la de PRS. Esta última, después de lavarla y secarla, se une a una tercera columna de C₁₈ y se procede a un proceso de elución con acetato amónico. Las aminas retenidas en el relleno de C₁₈ son eluidas con metanol-amoníaco.

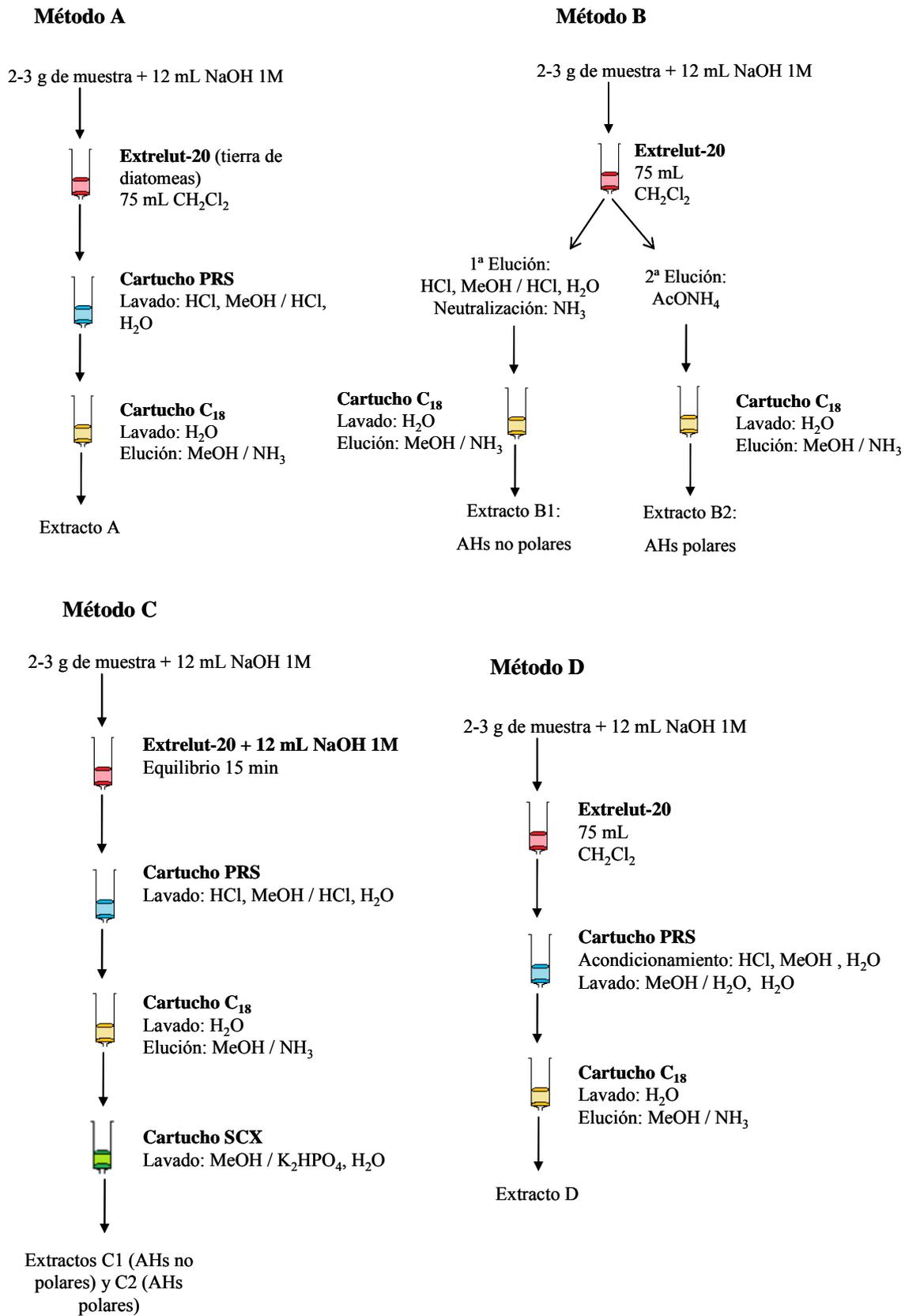


Figura I.5.1. Métodos tradicionales de tratamiento de muestra para la determinación de AHs en extractos de carne.

Método B: El procedimiento es similar al referido anteriormente, en lo que se refiere al tratamiento de la muestra, hasta el empleo de la columna de PRS [212]. A continuación se realizan dos procesos de elución diferentes. El primero de ellos utiliza como eluyente HCl, metanol/HCl y agua, para separar las aminas menos polares. La disolución obtenida, se neutraliza con amoníaco y se hace pasar a través de una columna de C₁₈, a partir de la que se eluyen dichas aminas con metanol/NH₃. En el otro proceso, se eluye la columna de PRS con acetato amónico y se acopla a la de C₁₈, procediendo como en el método A, para obtener el extracto constituido por las aminas polares. Finalmente, los dos extractos obtenidos se procesan por separado.

Método C: Básicamente coincide con el método A. La diferencia principal [35] se encuentra en que el extracto final del método A, procedente de la elución del cartucho C₁₈, se somete a purificación haciéndolo pasar por un cartucho con un relleno de intercambiador aniónico fuertemente básico (SCX). Las aminas retenidas se eluyen, como en A, con metanol y acetato amónico.

Método D: A diferencia del método A, la columna PRS se acondiciona con HCl, agua y metanol. Posteriormente esta columna se lava con metanol/agua en lugar de metanol/HCl [204].

Los métodos A, B y D dan lugar a recuperaciones similares (en torno al 60-90%) [212]. En otro orden de cosas, el método modificado A requiere menor cantidad de material y proporciona valores ligeramente más altos en las recuperaciones. Sin embargo, el método C da lugar a mayores eficiencias en los pasos de limpieza para algunas AHs polares, aunque se obtienen recuperaciones más bajas y altas desviaciones estándar; además, no se recupera alguna de las AHs no polares [212] y coeluyen algunas sustancias interferentes. Por otra parte, el método B parece ser el más consistente para muestras que contienen tanto AHs polares como no polares [212] y el método D es el más rápido y adecuado para procedimientos de *screening* de materiales desconocidos [18, 202].

Extracción con fluidos supercríticos (SFE)

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica que emplea un disolvente en condiciones supercríticas. Los fluidos supercríticos presentan propiedades intermedias

entre un gas y un líquido, que favorecen su penetración en diferentes matrices y, por lo tanto, la extracción de los solutos. Es una técnica eficiente y fiable, que presenta algunas ventajas: permite la extracción y concentración de los compuestos volátiles en un solo paso, minimizando las pérdidas potenciales de los compuestos y proporcionando así un extracto metanólico que puede ser analizado directamente por GC-MS. Esta técnica presenta la desventaja de que el restrictor de flujo puede sufrir envenenamiento cuando las muestras están húmedas o contienen grandes cantidades de material extraíble y partículas de materia. Esta técnica sólo se ha aplicado a la extracción de AHs en muestras de humos de cocción [25].

Microextracción en fase sólida (SPME)

Las técnicas de extracción tradicionales, como la LLE y, en particular, la SPE, están caracterizadas por algunas desventajas intrínsecas como es el uso de disolventes tóxicos y el empaquetamiento de los cartuchos. Estos inconvenientes pueden superarse mediante la microextracción en fase sólida (SPME). Esta técnica permite una extracción y preconcentración simultáneas de los analitos desde matrices gaseosas, acuosas y sólidas. El principio de la SPME es el equilibrio de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase polimérica que normalmente recubre una fibra de sílice fundida. La cantidad de analito adsorbido por la fibra es proporcional a la concentración inicial. Para aplicarlo a compuestos no volátiles o térmicamente inestables, la SPME debe realizarse en combinación con HPLC [214], o electroforesis capilar. Además de la simplificación del paso de limpieza, este método elimina las diferentes etapas de extracción en fase sólida requeridas en el análisis de AHs, reduciendo el tiempo y las cantidades de disolventes orgánicos necesarios [215].

La microextracción en fase sólida *in-tube* es adecuada para la extracción de compuestos menos volátiles o térmicamente inestables que no se pueden determinar por GC o GC-MS, como las AHs. Kataoka *et al* [186] desarrollaron un método para la determinación de AHs en alimentos mediante esta técnica. La muestra se trata con HCl y se centrifuga. Posteriormente, el sobrenadante se neutraliza con NaOH y las AHs son extraídas por el método de adsorción “Blue rayon”. El extracto se pasa a través de una jeringa con un microfiltro, y una columna capilar se utiliza como un dispositivo SPME. Esta columna se coloca entre el *loop* y la aguja de inyección del muestreador automático. El método es simple, rápido, automático, y presenta sensibilidades entre 3 y 20 veces superior en comparación con el método de inyección directa.

I.6 Separación de Aminas Heterocíclicas

Todas las aminas heterocíclicas contienen de dos a cinco, generalmente tres, anillos aromáticos conjugados, algunos de los cuales tienen uno o más nitrógenos y, generalmente, un grupo amino primario unido a uno de los anillos (Tablas I.1.1 y I.1.2). Es por ello que la determinación de estos analitos puede llevarse a cabo utilizando la cromatografía líquida como técnica de separación. Además, todas las AHs tienen un espectro Vis-UV característico con elevados coeficientes de extinción molar, pueden ser oxidadas electroquímicamente y algunas son fluorescentes, lo que hace posible la detección Vis-UV, electroquímica o fluorescente. Otra alternativa es la espectrometría de masas (MS) con ionización a presión atmosférica, ya que las AHs se protonan con facilidad proporcionando picos intensos adecuados para la cuantificación. Estos sistemas de detección pueden ser utilizados en electroforesis capilar (CE), una técnica de separación de elevada eficacia.

También es posible el uso de la cromatografía de gases (GC) con detección de captura de electrones, selectiva de nitrógeno o MS. Sin embargo, muchas de estas aminas son polares y no volátiles, por lo que puede ser necesario, en ocasiones, introducir procesos de derivatización.

En la bibliografía se encuentran trabajos que determinan AHs mediante técnicas de inmunoensayo (ELISA), muy sensibles pero a la vez complejas y con el peligro de reacciones cruzadas [216, 217].

Las técnicas de determinación de aminas heterocíclicas se han recopiladas en varios trabajos [8, 152, 218].

I.6.1 Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases ha sido ampliamente utilizada para el análisis de aminas por su alto poder de resolución y bajo coste. Sin embargo, las AHs son compuestos polares y poco volátiles, y tienden a eluirse dando lugar a picos con cola, debido a su fuerte adsorción en la columna y en el inyector. Por esta causa, debe realizarse una etapa de derivatización previa al

análisis, con objeto de reducir la polaridad de los compuestos, aumentar su volatilidad y mejorar la separación cromatográfica. Entre los agentes derivatizantes utilizados se encuentran el cloruro de 3,5-bis(trifluorometil)benzoilo (bis-TFMBO), el bromuro de 3,5-bis(trifluorometil)bencilo (bis-TFMB), el bromuro de pentafluorobencilo (PFB), anhídrido heptafluorobutírico (HFBA), anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA), diazometano y N,N-dimetilformamidimidilacetil (N,N-DMFDA) [164, 169].

En lo que respecta a los detectores empleados en GC para la determinación/identificación de AHs destacan el detector selectivo de nitrógeno y fósforo (NPD) y la espectrometría de masas (MS).

La cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas es uno de los mejores sistemas de identificación on-line debido a que combina la elevada eficiencia de separación de GC capilar con la selectividad y alta sensibilidad de MS. Además, existe la posibilidad de confirmar la identidad de los analitos mediante su espectro de masas [2, 156, 219]. Varios trabajos utilizan la ionización electrónica (EI) para dar lugar a espectros de fragmentación característicos, utilizables para la confirmación de los analitos o para su cuantificación. Otro método de ionización utilizado es la ionización química negativa (NICI), con amoníaco o con metano. La cuantificación de las AHs en GC-MS se lleva a cabo normalmente por análisis de dilución isotópica, aunque los estándares marcados isotópicamente no siempre están disponibles para todas las aminas. Además, utilizando un solo estándar se podrían dar resultados erróneos debido a que las AHs no son extraídas con las mismas recuperaciones, a pesar de que proceden de la misma clase de compuestos [152].

Como alternativa a la detección con espectrometría de masas destaca el detector selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD), con la ventaja de la alta respuesta para estos compuestos, debido a los átomos de nitrógeno presentes en la estructura de las AHs [220].

La Tabla I.6.1 recoge los límites de detección para la determinación de aminas por GC-NPD y GC-MS.

Tabla I.6.1. Límites de detección de AHs determinadas mediante cromatografía de gases.

Método	AHs térmicas										Ref.	
	PhIP	IQ	MeIQ	IQx	MeIQx	7,8-DiMeIQx	4,8-DiMeIQx	Trp-P-1	Trp-P-2	MeA α C		
GC-NPD	15	2	4	8	8	10	10					[220]
GC-EI-MS	6	50	50	6.0	6.0	7.5	7.5					[2]
GC-HREI/LREC-MS-SIM	0.5			0.5	0.5	1	1					[169]
GC-EI-MS-SIM	0.12	0.09	0.09	0.05	0.05	0.06	0.08					[199]
AHs pirolíticas												
	Glu-P-2	Glu-P-1	H	NH	A α C	MeA α C	Trp-P-2	Trp-P-1				Ref.
GC-NPD	14	8			9		14	3				[220]
GC-NICI-MS-SIM			0.1	0.1	0.5	0.1	2	0.1				[156]
GC-EI-MS-SIM				0.02	0.05	0.07	0.29	0.35				[199]

^a:inyectados

I.6.2 Cromatografía líquida (LC)

Debido a algunas características de las AHs, entre las que destacan su alta polaridad y a que son térmicamente inestables, la cromatografía líquida se presenta como una de las técnicas que más se utiliza en la determinación de estos compuestos.

Tal y como se ha indicado anteriormente, las AHs poseen espectros Vis-UV característicos, pueden ser oxidadas electroquímicamente, y algunas de ellas son fluorescentes, pudiéndose analizar mediante HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica. La cromatografía líquida con detección fluorescente o electroquímica presenta una alta selectividad y sensibilidad, aunque estos detectores están restringidos a la determinación de grupos seleccionados. La sensibilidad de la HPLC con detección Vis-UV no es alta, unas 100-400 veces menor que la proporcionada por la detección fluorescente, pero ésta no permite la confirmación de los picos cromatográficos. De esta manera, el método de detección utilizado más comúnmente es la detección Vis-UV con diodos en serie (DAD), que permite la identificación *on line* de los analitos. Normalmente, la detección fluorescente se utiliza como un complemento a la detección de diodos en serie para eliminar las interferencias producidas o para confirmar la identidad de los picos obtenidos.

La detección electroquímica está basada en la oxidación de las AHs al potencial de trabajo. Estos detectores ofrecen un incremento en la sensibilidad comparados con los detectores Vis-UV, pero no poseen la capacidad de confirmar los picos *on-line*, lo cual es crucial para el análisis de las AHs a las bajas concentraciones a las que se encuentran en los alimentos. La selectividad de la detección electroquímica se debe al hecho de que las AHs se oxidan a potenciales más bajos que otros compuestos [221]. La mayoría de las impurezas e interferencias detectadas en Vis-UV no se oxidan a los potenciales de trabajo y no perturban la detección de las AHs.

En las Tablas I.6.2 y I.6.3 se recogen los límites de detección para las AHs térmicas y pirolíticas, obtenidos cuando se emplea HPLC con detección Vis-UV, fluorescente o electroquímica. Como se puede apreciar, la absorción Vis-UV es la técnica de detección más popular, ya que permite detectar simultáneamente la mayoría de las AHs a longitudes de onda de aproximadamente 260 nm. Además, el uso del detector de diodos en serie permite una cierta confirmación del pico cromatográfico mediante la comparación del espectro Vis-UV con el correspondiente a una disolución patrón. En estos casos, los límites de detección para disoluciones patrón se encuentran generalmente entre 0.05 y 1 ng inyectados. En el caso de

muestras, dependiendo de la complejidad de la matriz y de la eficiencia del método de tratamiento de muestra, los valores oscilan en general entre 0.1 y 1 ng g⁻¹ para el caso de alimentos cocidos y entre 3 y 20 ng g⁻¹ para extractos de carne.

Debido a los relativamente elevados límites de detección de la combinación LC-UV y a la baja selectividad de este sistema de detección, algunos autores han optado por el uso del detector de fluorescencia, ya que proporciona límites de detección del orden de 0.001-15 ng inyectados para disoluciones estándar. En el caso de muestras, los límites de detección están alrededor de 0.015 y 0.81 ng g⁻¹ para cualquier tipo de muestra. Desafortunadamente, con esta técnica se restringe el análisis a la determinación de carbolinas y/o PhIP, que son las únicas AHs fluorescentes. Es por ello que muchos autores utilizan el detector de fluorescencia conjuntamente con otro tipo de detección, como Vis-UV o electroquímica.

La detección electroquímica proporciona en general límites de detección entre 35 pg y 3.37 ng inyectados y 1 ng·g⁻¹ para todos los analitos estudiados en el caso de patrones. En muestras, el valor es de 0.2-030 ng g⁻¹.

Tabla I.6.2. Límites de detección de las AHs térmicas determinadas mediante HPLC.

Sistema de Detección		PhIP	IQ	MeIQ	IQx	MeIQx	7,8-DiMeIQx	4,8-DiMeIQx	Otras	Ref.
ng ^a	Fluorescente-DAD / Fluorescente-UV	0.4	4	10	2	2	1	4		[90]
ng ^a		4			2	1	1	1		[222]
ng ^a		0.001			0.1	0.1		0.1		[93]
ng g ⁻¹		0.01			0.03	0.03		0.02		[223]
ng g ⁻¹		0.08	0.81	0.28	0.06	0.06				[14]
ng ^a		1.5			15	1.5	3	1.5		[224]
DAD / UV										
ng g ⁻¹		0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1		[51]
ng g ⁻¹		9.1	4.6	4.3	3.4	3.4	3.3	3.1	TriMeIQx: 2.8	[19]
ng ^a		0.03	0.13	0.15	0.30	0.30		0.06		[113]
ng ^a		2.0	0.4	0.4	0.8	0.8		1.0		[225]
ng mL ⁻¹				5	3.6	3.6				[215]
Electroquímica										
ng ^a		0.26	0.74	1.72	1.34	1.34		3.37		[161]
ng g ⁻¹		2	1.6	2	0.7	0.7	2	0.2	DMIP: 0.6	[60]
ng g ⁻¹		10	8	30	8	8	2	30	DMIP: 15	[60]
pg ^a			37	70	35	35				[163]
ng g ⁻¹			4.8	8.4	4.6	4.6				[226]
ng g ⁻¹			1.4	2.1	1.5	1.5		2.5	DMIP: 0.8	[171, 105]

^ainyectados

Tabla I.6.3. Límites de detección de las AHs pirolíticas determinadas mediante HPLC.

Sistema de Detección		Fluorescente-DAD / Fluorescente-UV									
		Glu-P-2	Glu-P-1	H	NH	A α C	MeA α C	Trp-P-2	Trp-P-1	Ref.	
ng ^a						5	5	0.3	0.3	[90]	
ng ^a						0.001				[93]	
ng g ⁻¹			0.16	0.54				0.015	0.03	[14]	
ng ^a			0.1	0.1	0.1	0.1	0.3			[110]	
DAD / UV											
ng g ⁻¹			5.3	5.1		0.21	3.8		0.12	[19]	
ng ^a										[113]	
ng mL ⁻¹			1.1	0.5		3.1	1.9	1.1	1	[215]	
ng mL ⁻¹			4.1	0.9		3.3	2.2	0.3	0.3	[215]	
ng mL ⁻¹			0.9	0.6		0.8	0.5	0.1	0.1	[215]	
Electroquímica											
ng ^a			0.51	0.26	0.26		0.74	0.19		[161]	
ng g ⁻¹		1.5	1.8	0.4	0.4	2.4	1.2	2	1	[60]	
ng g ⁻¹		nc ^b	nc ^b	4	2	6	nc ^b	5	nc ^b	[60]	
ng g ⁻¹			4.2							[226]	

^ainyectados.^bnc = no cuantificado

El acoplamiento LC-MS combina la efectividad en la separación y la versatilidad de la cromatografía líquida con la elevada sensibilidad y selectividad de la espectrometría de masas. Dado que el espectrómetro de masas funciona como un detector específico del analito, las posibles interferencias quedan considerablemente reducidas comparado con otras técnicas de detección, con lo cual es posible simplificar los complejos tratamientos de muestra empleados comúnmente. Otra ventaja de la combinación LC-MS es la posibilidad de confirmar la identidad del analito mediante el espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico. Además, algunos instrumentos, como el de triple cuadrupolo o el de trampa iónica, permiten la realización de experimentos MS/MS, que posibilitan una detección aún más selectiva que la MS. Todas estas cualidades, junto con las mejoras introducidas en los últimos años en el acoplamiento entre las dos técnicas, han facilitado la aparición de un creciente número de publicaciones que analizan AHs mediante LC-MS. Las Tablas I.6.4 y I.6.5 recogen los límites de detección obtenidos en la determinación de aminas térmicas y pirolíticas mediante LC-MS. Como puede observarse, los límites de detección alcanzados son inferiores en la mayoría de los casos, a los obtenidos cuando se emplean otros sistemas de detección (Vis-UV, fluorescente o electroquímico).

Los primeros trabajos relacionados con el análisis de AHs por LC-MS aparecidos en la literatura utilizaban ionización por termopulverización (TSP) y espectrómetros de masas cuadrupolares. En estos casos, los espectros de masas obtenidos proporcionaban mayoritariamente el ión molecular protonado $[M+H^+]$, el cual podía ser directamente utilizado para la cuantificación. Más tarde, la ionización por TSP fue sustituida por fuentes de ionización más robustas a presión atmosférica (API), bien por electrospray (ESI) o química (APCI). Las técnicas de ionización API, al igual que la TSP, proporcionan espectros con poca fragmentación, por lo que el pico base de las AHs corresponde al ión molecular protonado. La mayoría de referencias describen el uso de instrumentos de cuadrupolo dotados de una fuente ESI, y realizan la adquisición en modo MS o tándem MS/MS.

En otros trabajos, los instrumentos empleados son también cuadrupolares, pero el acoplamiento se realiza con una fuente APCI. La adquisición se lleva a cabo en modo MS o MS/MS. Por último, hay un reducido número de publicaciones que utilizan instrumentos de trampa iónica, bien con ESI en modo MS, o con APCI en modo MS.

Tabla I.6.4. Límites de detección de las AHs térmicas determinadas mediante cromatografía líquida – espectrometría de masas.

Sistema de Detección		DMIP	PhIP	IQ	MeIQ	8-MeIQx	7,8-DiMeIQx	4,8-DiMeIQx	Otras	Ref.
MS	APCI		0.4	0.2	0.2	1.0		1.4		[158]
	APCI-SIM		0.6	0.6	0.6	0.6	1.1		TriMeIQx: 1.1	[188, 189]
	APCI-IT		1.5	4.9	10.1	5.3	2.9	2.7		[202]
	AP-ESI-SIM		1.7 - 2.4	3.9 - 4.3	6.5 - 10.2	2.9 - 5.2	3.1 - 4.5	3.2 - 4.4		[18]
	ESI		0.21	0.39	0.55	0.53	0.92	1.33		[186]
	ESI-SIM		0.3	0.2	0.3	1.1		0.2		[157]
	ESI-IT		3	3						[210]
	ESI-IT-SIM	5	13	2	5	6	3	5		[205]
			1							[31]
MS - MS										
	APCI-IT	10.3	0.7	1.0	1.1	1.2	0.9	1.0		[86]
	ESI-SRM	4.9	1.6	2.3	2.4	1.6	1.5	1.7		[86]
			0.4			3.1		1.1		[37]
		0.07	0.08	0.06	0.08	0.10	0.06	0.09		[20]
		0.042	0.015	0.025	0.017	0.009	0.034	0.024		[20]
	ESI-IT	3.6	1.3	0.6	0.7	2.9	1.1	1.2		[204]
	ESI-SIM	0.4	0.4	0.7	0.4	1.1	0.5	0.5		[204]
	ESI-MRM	0.1	0.01	0.04	0.04	0.1	0.1	0.5		[204]
	Py-MAB-ToF-MS		0.9		0.3	0.15		1.5	IQx: 0.9	[227]

^ainyectados

Tabla I.6.5. Límites de detección de las AHs pirolíticas determinadas mediante cromatografía líquida – espectrometría de masas.

Sistema de Detección		Glu-P-2	Glu-P-1	H	NH	AcC	MeAcC	Trp-P-2	Trp-P-1	Ref.
MS										
APCI	ng g ⁻¹		0.4	0.08	0.1	0.3	0.4	0.8	0.4	[158]
APCI-SIM	ng mL ⁻¹							0.6 ± 0.3	1.1 ± 0.4	[188, 189]
APCI-IT	ng g ⁻¹	7.9	9.0	2.7	2.3	0.8	1.0	1.9	1.7	[202]
AP-ESI-SIM	ng g ⁻¹	3.7 - 5.4	4.7 - 9.1	3.0 - 5.2	2.8 - 3.6	0.4 - 1.2	0.7 - 1.3	2.0 - 11.7	2.4 - 15.0	[18]
ESI	ng mL ⁻¹	2.71	3.13			1.57		0.95	1.45	[186]
ESI-SIM	ng g ⁻¹		2.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	[157]
ESI-IT	ng g ⁻¹			1	1	6		5	4	[210]
	pg ^a	3	2	3	3	8	8	4	3	[205]
MS - MS										
APCI-IT	ng g ⁻¹	1.2	1.7	3.0	1.8	0.4	0.4	0.8	0.8	[86]
	ng g ⁻¹	2.7	4.6	2.5	1.6	1.0	0.8	1.7	3.1	[86]
ESI-SRM	pg mL ⁻¹					1.1				[37]
	pg ^a	0.09	0.08	0.18	0.19	0.11	0.17	0.23	0.16	[20]
ESI-IT	ng g ⁻¹	0.009	0.017	0.045	0.051	0.023	0.014	0.028	0.005	[20]
ESI-SIM	ng g ⁻¹	1.9	1.4	0.6	0.3	1.7	1.7	0.6	0.1	[204]
ESI-MRM	ng g ⁻¹	0.8	0.6	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.04	[204]
	ng g ⁻¹	0.1	0.1	0.1	0.04	0.02	0.02	0.02	0.02	
Py-MAB-ToF-MS	ng ^a	0.5				0.6		1.2	0.3	[227]

^a:inyectados

I.6.3 Métodos de cromatografía en capa fina (HPTLC)

La cromatografía en capa fina de alta resolución es un método *off-line* versátil y que ofrece múltiples posibilidades de detección debido a la fijación local de las sustancias separadas. Esta técnica ha sido aplicada con éxito a la separación y cuantificación de AHs no polares y pirolíticas [228]. Las aminas se separan en una placa de gel de sílice con dietiléter, cuantificándose mediante detección fluorescente. Recientemente, se han propuesto otros métodos en los cuales todos los pasos de HPTLC se llevan a cabo automáticamente [229].

I.6.4 Electroforesis capilar (CE)

Comparada con HPLC, la electroforesis capilar es capaz de alcanzar altas eficiencias de separación, utilizando menos disolventes orgánicos y, además, requiere pequeñas cantidades de muestra. Sin embargo, para la migración de los compuestos ionizados en el sistema electroforético, se conocen menos datos que para la retención en HPLC.

Las metodologías propuestas para el análisis de AHs emplean, en la mayoría de los casos, detección ultravioleta (CE-UV) [165, 230] o diodos en serie (CE-DAD) [166, 185, 206, 231, 232], aunque también detección electroquímica (CE-detección electroquímica) [174] o espectrometría de masas (CE-MS) [233].

En la Tabla I.6.6 se recogen los límites de detección para las AHs térmicas y pirolíticas, obtenidos cuando se emplea la electroforesis capilar con distintos sistemas de detección.

Tabla I.6.6. Límites de detección de AHs determinadas mediante electroforesis capilar.

Método	AHs térmicas									
	PhIP	IQ	MeIQ	MeIQx	7,8-DiMeIQx	4,8-DiMeIQx	Otras	Trp-P-1	Trp-P-2	Ref.
MEKC-Electroq.		4.0	9.6	7.4	9.4	12	TriMeIQx: 21			[174]
CZE-UV-DAD		0.13		0.12		0.08				[166]
		0.20		0.05		0.14				[166]
		1.05	0.674	0.542			Iso-IQ: 0.596			[206]
	7.96	7.25	3.14				Iso-IQ:1.33			[206]
AHs pirolíticas										
	Glu-P-2	Glu-P-1	H	NH	A α C	MeA α C	Trp-P-2	Trp-P-1	Ref.	
MEKC-Electroq.	8.5	7.0								[174]
CZE-UV-DAD			1.40	1.78	1.06	0.971				[206]
			3.99	3.51	18.3	19.4				[206]

I.7 Objetivos Generales

Las aminas heterocíclicas (AHs) son compuestos con elevada actividad mutagénica y carcinogénica, que se generan durante el procesado térmico de alimentos proteicos. Uno de los aspectos más relevantes, para la evaluación de la importancia de las AHs en la etiología del cáncer, es el establecimiento de la ingesta diaria de estos compuestos a partir de datos de consumo y niveles de concentración. Dado que las AHs se generan a baja concentración (0-100 ng g⁻¹), es necesario desarrollar metodologías analíticas altamente sensibles y selectivas, que permitan determinar su contenido en los alimentos. Sin embargo, debido por un lado a los bajos niveles de concentración en que pueden estar presentes y, por otro lado, la elevada complejidad de las matrices de los alimentos, no es fácil disponer de métodos de análisis adecuados para su determinación.

En la presente Tesis, se ha plantado, como objetivo central, el desarrollo de nuevas metodologías para el análisis de AHs en alimentos procesados a alta temperatura que, además de presentar suficiente sensibilidad y selectividad, permitan obtener resultados fiables en el menor tiempo posible y con la utilización de reactivos menos contaminantes y/o tóxicos.

Para alcanzar el objetivo planteado, la atención se ha centrado en los siguientes objetivos parciales:

1. Establecer métodos analíticos basados en la microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a la cromatografía líquida (HPLC), no tan desarrollada como el acoplamiento con la cromatografía de gases, para la determinación de AHs en alimentos.

Entre otras ventajas, se pretende conseguir, con respecto a las técnicas convencionales para la extracción de AHs: una reducción en el tiempo empleado en el tratamiento de las muestras y en el uso de disolventes orgánicos con frecuencia perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

La consecución de dicho objetivo parcial requiere:

- El estudio del comportamiento y optimización de las variables experimentales que afectan a los procesos de absorción/desorción relacionados con los métodos SPME-HPLC.
- La optimización de métodos de análisis cuantitativos para la determinación por HPLC, después de la separación de los analitos por SPME, que permitan la cuantificación de las AHs contenidas en alimentos a concentraciones del orden de ng g^{-1} .
- Establecer y optimizar las condiciones apropiadas para la solubilización de AHs contenidas en extractos de carne, como paso previo en su determinación por SPME-HPLC, por medio de ultrasonidos y microondas focalizadas.
- Determinar las eficiencias de recuperación y el contenido de AHs en muestras de distinta naturaleza.

2. Introducir líquidos iónicos (LIs) de la familia del alquilimidazolio como aditivos a la fase móvil en la determinación de AHs mediante HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica.

Los principales problemas asociados a la determinación de las AHs por HPLC, utilizando fases estacionarias de sílice, son las interacciones silanofílicas que dan lugar a picos asimétricos y bajas eficacias. El uso de LIs como supresores de los grupos silanol permitirá no sólo obtener mejoras en las formas de los picos cromatográficos sino una disminución en la retención de las AHs, con la consiguiente disminución del tiempo de análisis.

La consecución de dicho objetivo parcial requiere:

- Estudiar las características ópticas y electroquímicas de los LIs utilizados, así como de las AHs en presencia de dichos LIs.
- Evaluar el efecto enmascarante de los grupos silanol residuales por los LIs para diferentes fases estacionarias.
- Estudiar el efecto de los LIs, como aditivos a la fase móvil, en el comportamiento cromatográfico de las AHs, usando distintas fases estacionarias y detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica.

- Establecer métodos de análisis cuantitativos para la determinación por HPLC de las AHs, usando LIs como aditivos a la fase móvil.
- Optimizar metodologías de tratamiento de muestra previas a la determinación mediante las técnicas cromatograficas establecidas para la determinación del contenido de AHs en muestras de distinta naturaleza.

3. Utilizar los líquidos iónicos como disolventes de desorción y supresores del efecto memoria en el acoplamiento SPME-HPLC para la determinación de AHs.

La conjunción del uso de los LIs, como aditivos a la fase móvil y como disolvente de desorción, permitirá conjugar las ventajas cromatográficas con las propiedades solubilizantes que presentan los LIs, conduciendo a métodos SPME-HPLC más sensibles y reproducibles.

I.8 Bibliografía

- [1] C. Krul, A. Luiten-Schuite, R. Baan, H. Verhagen, G. Mohn, V. Feron, R. Havenaar. *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 783-792.
- [2] L. Warzecha, B. Janoszka, U. Blazczyk, M. Srózyk, D. Bodzek, C. Dobosz. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 95-106.
- [3] K. Skog. *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 655-675.
- [4] K. Skog, M.A.E. Johansson, M. Jägerstad. *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 879-896.
- [5] M. Jägerstad, K. Skog, S. Grivas, K. Olsson. *Mutation Res.-Genetic Toxicol. And Environ. Mutagenesis* 259 (1991) 219-233.
- [6] S. Robbana Barnat, M. Rabache, E. Rialland, J. Fradin. *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 280-288.
- [7] N.J. Gooderham, S. Murray, A.M. Lynch, R.J. Edwards, M. Yadollahi Farsani, C. Bratt, K.J. Rich, K. Zhao, B.P. Murray, S. Bhadresa, S.J. Crosbie, A.R. Boobis, D.S. Davies. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 42 (1996) 91-98.
- [8] M.T. Sanz-Alaejos, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso. *J. Chromatogr. B* 862 (2008) 15-42.
- [9] *International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs of the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Lyon, 1993; V. 56.
- [10] *NTP Report on Carcinogens*, Eleventh Edition. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Toxicology Program, 2004, pp. 135-138.
- [11] M. Nagao, M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Sugimura. *Cancer Lett.* 2 (1977) 221-226.
- [12] B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki. *Mutat. Res.* 31 (1975) 347-364.
- [13] L.S. Jackson, W.A. Hargraves. *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1678-1684.
- [14] P. Arvidsson, M.A.J. van Boekel, K. Skog, M. Jägerstad. *J. Food Sci.* 62 (1997) 911-916.
- [15] H.P. Thiebaud, M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, D.P. Hsieh, J.S. Felton. *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 821-828.
- [16] T. Herraiz. *Food Addit. Contam.* 21 (2004) 1041-1050.

- [17] H. Tsuchiya, M. Sato, H. Hayashi, H. Kato, H. Kureshiro, T. Hayashi. *Chromatographia* 43 (1996) 419-425.
- [18] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 101-112.
- [19] M. Vollenbroeker, K. Eichner. *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2000) 122-125.
- [20] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, M.T. Galcerán, J.L. Lliberia, B. Bagó, M.A. Cortes. *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 195-203.
- [21] F. Calbiani, M. Careri. *Food Add. Contam.* 24 (2007) 833-841.
- [22] S. Casal, E. Mendes, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira. *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 105-114.
- [23] E. Richling, C. Decker, D. Haring, M. Herderich, P. Schraier. *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 71-77.
- [24] S. Vainiotalo, K. Matveinen, A. Reunanen. *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 462-466.
- [25] H.P. Thiebaud, M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, J.S. Felton, D.P.J. Hsieh. *Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1502-1510.
- [26] T.A. Sasaki, J.M. Wilkins, J.B. Forehand, S.C. Moldoveanu. *Anal. Lett.* 34 (2001) 1749-1761.
- [27] C.J. Smith, X.L. Qian, Q.M. Zha, S.C. Moldoveanu. *J. Chromatogr. A* 1046 (2004) 211-216.
- [28] S. Manabe, N. Kurihara, O. Wada, S. Izumikawa, K. Asakuno, M. Morita. *Environ. Pollut.* 80 (1993) 281-286.
- [29] H. Kataoka, T. Hayatsu, G. Hietsch, H. Steinkellner, S. Nishioka, S. Narimatsu, S. Knasmuller, H. Hayatsu. *Mutat. Res.* 466 (2000) 27-35.
- [30] Y. Ono, I. Somiya, Y. Oda. *Water Res.* 34 (2000) 890-894.
- [31] S. Prabhu, M.J. Lee, W.Y. Hu, B. Winnik, I. Yang, B. Buckley, J.Y. Hong. *Anal. Biochem.* 298 (2000) 306-313.
- [32] S. Hegstad, E. Lundanes, R. Reistad, L.S. Haug, G. Becher, J. Alexander. *Chromatographia* 52 (2000) 499-504.
- [33] P.T. Strickland, Z. Qian, M.D. Friesen, N. Rothman, R. Sinha. *Biomarkers* 6 (2001) 313-325.
- [34] H.J.J. Moonen, E.J.C. Moonen, L. Maas, J.W. Dallinga, J.C.S. Klinjans, T.M.C.M. de Kok. *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 869-878.
- [35] S. Sentellas, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 193-201.
- [36] L.S. DeBruin, P.A. Martos, P.D. Josephy. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1523-1528.

- [37] K.A. Scott, R.J. Turesky, B.C. Wainman, P.D. Josephy. *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 88-94.
- [38] L. Maillard. *Compt. Rend.* 154 (1912) 66-68.
- [39] M. Jägerstad, K. Skog, P. Arvidsson, A. Solyakov. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 419-427.
- [40] P. Arvidsson, M.A.J.S. van Boekel, K. Skog, A. Solyakov, M. Jägerstad. *Food Sci.* 64 (1999) 216-221.
- [41] P. Pais, M.J. Tanga, C.P. Salmon, M.G. Knize. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1721-1726.
- [42] K. Kikugawa. *Cancer Lett.* 143 (1999) 123-126.
- [43] H. Lee, M.Y. Lin, N.J. Hao. *Mutagenesis* 10 (1995) 179-183.
- [44] M. Jägerstad, A.L. Reuterswärd, R. Oste, R. Dahlgvist, S. Grivas, K. Olsson, T. Nyhammar. *ACS Symp. Ser.* 215 (1983) 507-519.
- [45] S. Zochling, M. Murkovic. *Food Chem.* 79 (2002) 125-134.
- [46] T. Herraiz. *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 483-499.
- [47] C.P. Chiu, B.H. Chen. *Food Chem.* 68 (2000) 267-272.
- [48] R.J. Turesky, J. Taylor, L. Schnackenberg, J.P. Freeman, R.D. Holland. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 3248-3258.
- [49] W. Ni, L. McNaughton, D.M. LeMaster, R. Sinha, R.J. Turesky. *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 68-78.
- [50] A. Solyakov, K. Skog. *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1205-1211.
- [51] B. Zimmerli, P. Rhyh, O. Zoller, J. Schlatter. *Food Addit. Contam.* 18 (2001) 533-551.
- [52] K. Skog, A. Solyakov, M. Jägerstad. *Food Chem.* 68 (2000) 299-308.
- [53] E. Persson, I. Sjöholm, K. Skog. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 4472-4477.
- [54] E. Persson, I. Sjöholm, K. Skog. *Eur. Food Res. Technol.* 214 (2002) 455-459.
- [55] C. Messner, M. Murkovic. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 19-26.
- [56] C.P. Salmon, M.G. Knize, F.N. Panteleakos, R.W. Wu, D.O. Nelson, J.S. Felton. *J. Nat. Cancer Inst.* 92 (2000) 1773-1778.
- [57] A. Ristic, M. Cichna, G. Sontag. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 87-94.
- [58] T. Polak, D. Došler, B. Žlender, L. Gašperlin. *Food Sci. Technol.* 42 (2009) 504-513.
- [59] G. Liao, X. Xu, G. Zhou. *J. Food Process Preserv.* 33 (2009) 159-175.

- [60] E. Bermudo, V. Ruiz Calero, L. Puignou, M.T. Galcerán. *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 83-90.
- [61] M. Costa, O. Viegas, A. Melo, C. Petisa, O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 3173-3179.
- [62] H.S. Shin. *Food Sci. Biotechnol.* 14 (2005) 572-575.
- [63] W. Pfau, K. Rosenvold, J.F. Young. *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 2086-2091.
- [64] B.H. Chen, K.H. Lee, C.Y. Tai. *J. Food Protect.* 63 (2000) 1415-1420.
- [65] M. Murkovic, W. Pfannhauser. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 375-378.
- [66] R. Sinha. *Mutat. Res.* 506-507 (2002) 197-204.
- [67] M. Bordas, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 11-17.
- [68] M. Murkovic. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106 (2004) 777-785.
- [69] Z. Balogh, J.I. Gray, E.A. Gomaa, A.M. Booren. *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 395-401.
- [70] M.A.E. Johansson, L. Fredholm, I. Bjerne, M. Jägerstad. *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 993-1004.
- [71] V. Olsson, K. Skog, K. Lundstrom, M. Jägerstad. *Food Qual. Pref.* 16 (2005) 91-101.
- [72] J. Ahn, I.U. Grun. *J. Food Sci.* 70 (2005) C173-C179.
- [73] J.S. Felton, M.G. Knize, F.T. Hatch, M.J. Tanga, M.E. Colvin. *Cancer Lett.* 143 (1999) 127-134.
- [74] P. Pais, C.P. Salmon, M.G. Knize, J.S. Felton. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1098-1108.
- [75] P. Arvidsson, M.A.J.S. van Boekel, K. Skog, A. Solyakov, M. Jägerstad. *J. Food Sci.* 64 (1999) 216-221.
- [76] M.G. Knize, F.A. Dolbeare, K.L. Carroll, D.H. Moore, J.S. Felton. *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 595-603.
- [77] G.A. Gross, A. Grüter. *J. Chromatogr.* 592 (1992) 271-278.
- [78] M. Sanz Alaejos, V. González, A.M. Afonso. *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 2-24.
- [79] J.C. Balbi, M.T. Larrinaga, E. De Stefani, M. Mendilaharsu, A. Ronco, P. Boffetta, P. Brennan. *Eur. J. Cancer Prev.* 10 (2001) 453-458.
- [80] K. Skog, Å. Eneroth, M. Svanberg. *Int. J. Food Sci. Technol.* 38 (2003) 313-323.
- [81] J.S. Felton, E. Fultz, F.A. Dolbeare, M.G. Knize. *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 897-903.
- [82] C.P. Chiu, D.Y. Yang, B.H. Chen. *J. Food Protect.* 61 (1998) 712-719.

- [83] J.S. Felton, M.G. Knize, M. Roper, E. Fultz, N.H. Shen, K.W. Turteltaub. *Cancer Res.* 52 (1992) S2103-S2107.
- [84] R. Sinha, N. Rothman, C.P. Salmon, M.G. Knize, E.D. Brown, C.A. Swanson, D. Rhodes, S. Rossi, J.S. Felton, O.A. Levander. *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 279-287.
- [85] Y.S. Gu, I.S. Kim, J.H. Park, S.H. Lee, D.C. Park, D.M. Yeum, C.I. Ji, S.H. Kim, K. Wakabayashi, S.B. Kim. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65 (2001) 2284-2287.
- [86] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 267-281.
- [87] R. Sinha, N. Rothman. *Mutat. Res.* 376 (1997) 195-202.
- [88] R. Sinha, E. Brown, N. Rothman, C. Swanson, M. Knize, J. Felton, O. Levander. *FASEB J.* 10 (1996) 3172-3176.
- [89] B. Thomson. *Eur. J. Cancer Prev.* 8 (1999) 201-206.
- [90] K. Skog, K. Augustsson, G. Steineck, M. Sternberg, M. Jägerstad. *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 555-565.
- [91] C.P. Salmon, M.G. Knize, J.S. Felton. *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 433-441.
- [92] G.A. Keating, R. Sinha, D. Layton, C.P. Salmon, M.G. Knize, K.T. Bogen, C.F. Lynch, M. Alavanja. *Cancer Causes & Control* 11 (2000) 731-739.
- [93] Y.S. Gu, I.S. Kim, J.K. Ahn, D.C. Park, D.M. Yeum, C.I. Ji, S.B. Kim. *Mutat. Res.* 515 (2002) 189-195.
- [94] B.G. Abdulkarim, J.S. Smith. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4680-4687.
- [95] E. Borgen, K. Skog. *Mol. Nutr. Food Res.* 48 (2004) 292-298.
- [96] R. Steinmann, A. Fischer. *Fleischwirtschaft* 80 (2000) 93-98.
- [97] Y.M. Back, J.H. Lee, H.S. Shin, K.G. Lee. *Food Addit. Contam. Part A-Chem.* 26 (2009) 298-305.
- [98] M.G. Knize, P.L. Cunningham, J.R. Avila, A.L. Jones, E.A. Griffin Jr., J.S. Felton. *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 55-60.
- [99] K. Skog, A. Solyakov. *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1213-1221.
- [100] E. Borgen, A. Solyakov, S. Skog. *Food Chem.* 74 (2001) 11-19.
- [101] M. Johansson, K. Skog, M. Jägerstad. *Carcinogenesis* 14 (1993) 89-94.
- [102] B. Janoszka, U. Błaszczuk, A. Damasiewicz-Bodzek, M. Sajewicz. *Food Chem.* 113 (2009) 1188-1196.

- [103] M.A.E. Johansson, M. Jägerstad. *Food Chem.* 56 (1996) 69-75.
- [104] K.-W. Cheng, F. Chen, M. Wang. *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 969-976.
- [105] M. Murkovic, D. Steinberg, W. Pfannhauser. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch. A-Foo* 207 (1998) 477-480.
- [106] B.L. Milic, N.B. Milic. *Phytother. Res.* 12 (1998) S3-S6.
- [107] H.S. Shin, W.J. Rodgers, A. Gooma, G.M. Strasburg, J.I. Gray. *J. Food Sci.* 65 (2002) 1766-1770.
- [108] H.S. Shin, W.J. Rodgers, G.M. Strasburg, J.I. Gray. *J. Food Sci.* 67 (2002) 3304-3308.
- [109] H.S. Shin, Z. Ustunol. *J. Food Sci.* 69 (2004) C147-C153.
- [110] C.Y. Tai, K.H. Lee, B.H. Chen. *Food Chem.* 75 (2001) 309-316.
- [111] P. Vitaglione, S.M. Monti, P. Ambrosino, K. Skog, V. Fogliano. *Eur. Food Res. Technol.* 215 (2002) 108-113.
- [112] S.M. Monti, A. Riteni, R. Sacchi, K. Skog, E. Borgen, V. Fogliano. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3969-3975.
- [113] C.M. Lan, B.H. Chen. *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 989-1000.
- [114] C.M. Lan, T.H. Kao, B.H. Chen. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 27-37.
- [115] B.N. Ames. *Science* 221 (1983) 1256-1264.
- [116] B.N. Ames, M. Profet, L.S. Gold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1999) 7777-7781.
- [117] A.E. Rogers, S.H. Zeisel, J. Goopman. *Carcinogenesis* 14 (1993) 2205-2217.
- [118] B.N. Ames, L.S. Gold, W.C. Willett. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 5258-5265.
- [119] P.T. Stickland, J.D. Goopman. *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995) 710s-720s.
- [120] National Research Council. National Academy Press, Washington, DC (1996).
- [121] R. Doll, R. Peto. *J. Natl. Cancer Inst.* 66 (1981) 1191-1308.
- [122] J. Austoker. *Br. Med. J.* 308 (1994) 1610-1614.
- [123] L. Kohlmeier. *Adv. Exp. Med. Biol.* 369 (1995) 125-139.
- [124] R. Doll. *Carcinogenesis* 17 (1996) 177-184.
- [125] L.S. Gold, T.H. Slone, B.N. Ames. D.R. Tennant (Ed.), *Food Chemical Risk Analysis*, Blackie Academic and Professional, London (1997) 267-295.
- [126] D.M. DeMarini. *Mutat. Res.* 400 (1998) 457-465.

- [127] L. Kohlmeier, N. Simonsen, K. Mottus. *Environ. Health Perspect.* 103 (8) (1995) 177-184.
- [128] M.E. Colvin, F.T. Hatch, J.S. Felton. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.* 400 (1998) 479-492.
- [129] F.T. Hatch, M.G. Knize, M.E. Colvin. *Environ. Mol. Mutagen.* 38 (2001) 268-291.
- [130] D.Y. Ryu, V.S.W. Pratt, C.D. Davis, H.A.J. E.G. Snyderwine. *Cancer Res.* 59 (1999) 2587-2592.
- [131] K. Imaida, M. Sano, S. Tamano, M. Asamoto, K. Ogawa, M. Futakuchi, T. Shirai. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1295-1299.
- [132] M. Nagao. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.* 431 (1999) 3-12.
- [133] R. Reistad, S.H. Nyholm, L.S. Haug, G. Becher, J. Alexander. *J. Biomarkers* 4 (1999) 263-271.
- [134] H. Kataoka. *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 121-142.
- [135] R. Sinha, U. Peters, A.J. Cross, M. Kulldorff, J.L. Weissfeld, P.F. Pinsky, N. Rothman, R.B. Hayes. *Cancer Res.* 65 (2005) 8034-8041.
- [136] K.E. Anderson, F.F. Kadlubar, M. Kulldorff, L. Harnack, M. Gross, N.P. Lang, C. Barber, N. Rothman, R. Sinha. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005) 2261-2265.
- [137] K. Augustsson, K. Skog, M. Jägerstad, P.W. Dickman, G. Steineck. *Lancet* 353 (1999) 703-707.
- [138] S.A. Bingham. *Proc. Nutr. Soc.* 58 (1999) 243-248.
- [139] E. De Stefani, A. Ronco, P. Brennan, P. Boffetta. *Nutr. Cancer* 40 (2001) 103-107.
- [140] A. Navarro, S.E. Muñoz, M.J. Lantieri, M.P. Díaz, P.E. Cristaldo, S.P. De Fabro, A.R. Eynard. *Eynard* 20 (2004) 873-877.
- [141] S. Nowell, B. Coles, R. Sinha, S. MacLeod, D.L. Ratnasinghe, C. Stotts, F.F. Kadlubar, C.B. Ambrosone, N.P. Lang. *Mutat. Res.* 506-507 (2002) 175-185.
- [142] J. Alexander, R. Reistad, S. Hegstad, H. Frandsen, K. Ingebrigtsen, JE. Paulsen, G. Becher. *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1131-1137.
- [143] G.A. Keating, K.T. Bogen. *Food Chem. Toxicol.* 39 (2001) 29-43.
- [144] G.A. Keating, D.W. Layton, J.S. Felton. *Mutat. Res.* 443 (1999) 149-156.
- [145] K. Skog. *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1197-1203.
- [146] M.T. Sanz-Alaejos, V. González, A.M. Afonso. *Food Add. Contam.* 25 (2008) 2-24.

- [147] H. Frandsen, H. Frederiksen, J. Alexander. *Food Chem. Toxicol.* 40 (2002) 1125-1130.
- [148] R.J. Turesky. *Drug Metabolism Reviews* 34 (2002) 625-650.
- [149] H.J.J. Moonen, E.J.C. Moonen, L. Maas, J.W. Dallinga, J.C.S. Kleinjans, T.M.C.M. de Kok. *Food Chem. Toxicol.* 42 (2004) 869-878.
- [150] R.J. Turesky. *Toxicol. Letters* 168 (2007) 219-227.
- [151] W.G. Stillwell, R.J. Turesky, R. Sinha, S.R. Tannenbaum. *Cancer Res.* 59 (1999) 5154-5159.
- [152] P. Pais, M.G. Knize. *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 139-169.
- [153] R. Busquets, M. Bordas, F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 79-86.
- [154] C.P. Salmon, M.G. Knize, J.S. Felton, B. Zhao, A. Seow. *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 484-492.
- [155] L. Agüí, C. Peña-Farfal, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingaron. *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 323-330.
- [156] K. Skog, A. Solyakov, P. Arvidsson, M. Jägerstad. *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 227-233.
- [157] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 775 (1997) 125-136.
- [158] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 207-218.
- [159] Y. Totsuka, H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi. *Cancer Lett.* 143 (1999) 139-143.
- [160] M.T. Galcerán, P. Pais, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 203-212.
- [161] M.T. Galcerán, P. Pais, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 655 (1993) 101-110.
- [162] A. Solyakov, K. Skog, M. Jägerstad. *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1-11.
- [163] M.M.C. Van Dyck, B. Rollmann, C. De Meester. *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 377-382.
- [164] S. Murray, A.M. Lynch, M.G. Knize, N.J. Gooderham. *J. Chromatogr. B* 616 (1993) 211-219.
- [165] L. Puignou, J. Casal, F.J. Santos, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 769 (1997) 293-299.
- [166] C. Mardones, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel. *Chromatographia* 48 (1998) 700-706.
- [167] L.B. Fay, S. Ali, G.A. Gross. *Mutat. Res.* 376 (1997) 29-35.
- [168] C. Krach, G. Sontag. *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 77-83.
- [169] R. Reistad, O.J. Rossland, K.J. Latva-Kala, T. Rasmussen, R. Vikse, G. Becher, J. Alexander. *Food Chem. Toxicol.* 31 (1997) 945-955.

- [170] R. Schwarzenbach, D. Gluber. *J. Chromatogr.* 624 (1992) 491-495.
- [171] M. Murkovic, M. Friedrich, W. Pfannhauser. *Z. Lebensm. -Unters. Forsch. A-Foo* 205 (1997) 347-350.
- [172] B. Janoszka, U. Blaszczyk, L. Warzecha, M. Strozyk, A. Damasiewicz-Bodzek, D. Bodzek. *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 155-165.
- [173] C.L. Holder, S.W. Preece, S.C. Conway, Y.M. Pu, D.R. Doerge. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1667-1672.
- [174] J.C. Olsson, A. Dyremark, B. Karlberg. *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 329-335.
- [175] B. Stavric, T.I. Matula, R. Klassen, R.H. Downie. *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 981-987.
- [176] B. Stavric, B.P.Y. Lau, T.I. Matula, R. Klassen, D. Lewis, R.H. Downie. *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 185-197.
- [177] B. Stavric, B.P.Y. Lau, T.I. Matula, R. Klassen, D. Lewis, R.H. Downie. *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 199-206.
- [178] N. Loprieno, G. Boncristiani, G. Loprieno. *Food Chem. Toxicol.* 29 (1991) 377-386.
- [179] M. Takahashi, K. Wakabayashi, M. Nagao, M. Yamamoto, T. Masui, T. Goto, N. Kinae, I. Tomita, T. Sugimura. *Carcinogenesis* 6 (1985) 1195-1199.
- [180] M. Takahashi, K. Wakabayashi, M. Nagao, Z. Yamaizumi, H. Sato, N. Kinae, I. Tomita, T. Sugimura. *Carcinogenesis* 6 (1985) 1537-1539.
- [181] R.J. Turesky, H. Bur, T. Huynh-Ba, H.U. Aeschbacher, H. Milon. *Food Chem. Toxicol.* 26 (1988) 501-509.
- [182] G. Gross, G. Philipposian, H.U. Aeschbacher. *Carcinogenesis* 10 (1989) 1175-1182.
- [183] G. Gross. *Carcinogenesis* 11 (1990) 1597-1603.
- [184] P. Pais, M.G. Knize. *LC GC-Mag. Sep. Sci.* 16 (1998) 378-384.
- [185] J. Wu, M.K. Wong, H.K. Lee, C.N. Ong. *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 712-716.
- [186] H. Kataoka, J. Pawliszyn. *Chromatographia* 50 (1999) 532-538.
- [187] R. Kurosaka, K. Wakabayashi, H. Ushiyama, H. Nukaya, N. Arakawa, T. Sugimura, M. Nagao. *Jpn. J. Cancer Res.* 83 (1992) 919-922.
- [188] I.S. Kim, K. Wakabayashi, R. Kurosawa, Z. Yamaizumi, F. Jinno, S. Koyota, A. Tada, H. Nukaya, M. Takahashi, T. Sugimura, M. Nagao. *Carcinogenesis* 15 (1994) 21-26.

- [189] H. Nukaya, S. Koyota, F. Jinno, H. Ishida, K. Wakabayashi, R. Kurosaka, I.S. Kim, Z. Yamaizumi, H. Ushiyama, T. Sugimura, M. Nagao, K. Tsuji. *Carcinogenesis* 15 (1994) 1151-1154.
- [190] J. Bang, H. Nukaya, K. Skog. *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 97-105.
- [191] J. Bang, H. Frandsen, K. Skog. *Chromatographia* 60 (2004) 651-657.
- [192] H. Hayatsu. *J. Chromatogr.* 597 (1992) 37-56.
- [193] T. Ohe. *Mutat. Res. -Genet. Toxicol. E. M.* 393 (1997) 73-79.
- [194] H. Hayatsu, T. Hayatsu, S. Arimoto, H. Sakamoto. *Anal. Biochem.* 235 (1996) 185-190.
- [195] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35-62.
- [196] F. Toribio, M.T. Galcerán, L. Puignou. *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 171-202.
- [197] B.H. Chen, D.J. Yang. *Chromatographia* 48 (1998) 223-230.
- [198] R.J. Turesky, A.K. Goodenough, W.J. Ni, L. McNaughton, D.M. LeMaster, R.D. Holland, R.W. Wu, J.S. Felton. *Chem. Res. Toxicol.* 20 (2007) 520-530.
- [199] S. Casal, E. Mendes, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira. *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 105-114.
- [200] P.A. Guy, E. Gremaud, J. Richoz, R.J. Turesky. *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 89-102.
- [201] P. Pais, M.J. Tanga, C.P. Salmon, M.G. Knize. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1721-1726.
- [202] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 307-317.
- [203] H.-S. Shin, H. Park, D. Park. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6726-6730.
- [204] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 67-78.
- [205] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 45-59.
- [206] X.Q. Fei, C. Li, X.D. Yu, H.Y. Chen. *J. Chromatogr. B* 854 (2007) 224-229.
- [207] F. Oz, G. Kaban, M. Kaya. *Food Chem.* 104 (2007) 67-72.
- [208] F. Toribio, R. Busquets, L. Puignou, M.T. Galceran. *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 667-675.
- [209] F.J. Santos, E. Barceló-Barrachina, F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán, E. Persson, K. Skog, C. Messner, M. Murkovic, U. Nabinger, A. Ristic. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 69-78.
- [210] M.T. Galcerán, E. Moyano, L. Puignou, P. Pais. *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 185-194.

- [211] E. Barceló-Barrachina, F.J. Santos, L. Puignou, M.T. Galcerán. *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 209-217.
- [212] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223-233.
- [213] G.A. Perfetti. *J. AOAC Int. A* 79 (1996) 813-816.
- [214] H. Lord, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 153-193.
- [215] L. Cárdenes, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 87-93.
- [216] M. Vanderlaan, B.E. Watkins, M. Hwan, M.G. Knize, J.S. Felton. *Carcinogenesis* 9 (1988) 153-160.
- [217] M. Vanderlaan, B.E. Watkins, M. Hwang, M.G. Knize, J.S. Felton. *Carcinogenesis* 10 (1989) 2215-2221.
- [218] T. Herraiz. *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 23-30.
- [219] P. Arvidsson, M.A.J.S. van Boekel, K. Skog, A. Solyakov, M. Jägerstad. *J. Food Sci.* 64 (1999) 216-221.
- [220] H. Kataoka, K. Kijima. *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 187-194.
- [221] H. Kataoka. *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 121-142.
- [222] K. Skog, M.G. Knize, J.S. Felton, M. Jägerstad. *Mutat. Res.* 268 (1992) 191-197.
- [223] M.A.E. Johansson, L. Fredholm, I. Bjerne, M. Jägerstad. *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 993-1004.
- [224] R.D. Holland, J. Taylor, L. Schoenbachler, R.C. Jones, J.P. Freeman, T.W. Miller, B.G. Lake, N.J. Gooderham, R.J. Turesky. *Chem. Res. Toxicol.* 17 (2004) 1121-1136.
- [225] L. Warzecha, B. Janoszka, U. Blazczyk, M. Srózyk, D. Bodzek, C. Dobosz. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 95-106.
- [226] L. Rivera, M.J.C. Curto, P. Pais, M.T. Galcerán, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 85-94.
- [227] E. Jamin, S. Chevolleau, C. Touzet, J. Tulliez, L. Debrauwer. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2931-2941.
- [228] G. Morlock. *JPC-J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC* 17 (2004) 431-434.
- [229] U. Jautz, G. Morlock. *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1083-1093.
- [230] J. Wu, M.K. Wong, H.K. Lee, B.L. Lee, C.Y. Shi, C.N. Ong. *Food Addit. Contam.* 13 (1996) 851-861.

- [231] J. Wu, M.-K. Wong, S.F.Y. Li, H.K. Lee, C.N. Ong. *J. Chromatogr. A* 709 (1995) 351-359.
- [232] S.D. Mendonsa, R.J. Hurtubise. *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Tech.* 22 (1999) 1027-1040.
- [233] Y.I. Zhao, M. Schelfaut, P. Sandra, F. Banks. *Electrophoresis* 19 (1998) 2213-2219.

CAPÍTULO II. ACOPLAMIENTO SPME-HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS



II.1. Introducción

II.2. Determinación de Aminas Heterocíclicas utilizando SPME acoplada a HPLC con detección Vis-UV

II.3. Determinación de Aminas Heterocíclicas utilizando SPME acoplada a HPLC con detección fluorescente

II.4. Determinación de Aminas Heterocíclicas utilizando SPME acoplada a HPLC con detección electroquímica *versus* inyección directa

II.5. Bibliografía

II.1 Introducción

II.1.1 Microextracción en Fase Sólida

La Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica de extracción desarrollada por Pawliszyn *et al.* [1], que representa un valioso avance en uno de los pasos fundamentales del proceso analítico, como es la preparación de muestras. La SPME se basa en el equilibrio de reparto de los analitos entre una fase polimérica estacionaria, que recubre una fibra de sílice fundida, y la matriz de la muestra.

La SPME comprende dos pasos. En primer lugar, los analitos son extraídos desde la matriz de la muestra, por contacto de la misma con una fibra recubierta de una fase activa, durante un tiempo determinado. En segundo lugar, la fibra se retira de la muestra y los analitos retenidos en ella se desorben en un instrumento analítico, generalmente un sistema cromatográfico.

La extracción mediante SPME puede llevarse a cabo de tres formas diferentes [2]:

Extracción directa: La fibra recubierta se coloca en el vial que contiene la muestra y los analitos son transportados directamente desde la fase líquida. Para facilitar una extracción rápida, a veces requieren métodos de agitación, como pueden ser los agitadores magnéticos o los sistemas de ultrasonidos, favoreciendo así el transporte de los analitos desde el seno de la disolución hasta las proximidades de la fibra [3]. Para muestras gaseosas, la convección natural y la difusión en el medio son suficientes para facilitar un equilibrio rápido.

Extracción en espacio de cabeza (HS-SPME): Los analitos necesitan ser transportados a través de la capa de aire que existe entre la fibra y la matriz antes de alcanzar el recubrimiento. Este hecho sirve para proteger el recubrimiento de la fibra del daño que le puedan causar especies de alto peso molecular y contaminantes no volátiles presentes en las matrices de las muestras líquidas. Este modo de muestreo permite también modificaciones de la matriz, como los cambios de pH, sin dañar la fibra [4].

Extracción con fibras protegidas con membranas: Es una variante de la extracción directa en la que la fibra, o mejor, el recubrimiento de la fibra, se protege frente a posibles daños colocando una membrana semipermeable alrededor de la fibra, que evita que compuestos de elevado peso molecular presentes en la matriz de la muestra dañen la fibra. Este modo de extracción es muy útil para el análisis de muestras sólidas o biológicas en las que la interferencia de la matriz es importante; sin embargo está restringido para compuestos volátiles y semivolátiles [5].

La Microextracción en Fase Sólida presenta importantes ventajas con respecto a las técnicas convencionales, para la extracción de compuestos orgánicos, tales como la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida para compuestos semivolátiles y no-volátiles:

- No requiere disolventes orgánicos, caros y perjudiciales para la salud y el medio ambiente.
- La técnica es muy simple, rápida, fácilmente automatizable, portátil y económica.
- Sólo se requiere un pequeño volumen de muestra.
- Puede acoplarse fácilmente a cromatografía de gases, con algunas modificaciones a cromatografía líquida y a electroforesis capilar.

Como inconveniente se puede mencionar que, debido a la limitada capacidad de extracción de las fibras (la cantidad de fase estacionaria es muy pequeña), la sensibilidad que puede alcanzarse es también limitada.

La técnica se desarrolló inicialmente para determinar compuestos relativamente volátiles, pero su uso se ha extendido al análisis de una gran variedad de matrices y analitos. Hasta la fecha, la SPME ha sido usada con éxito para análisis de muestras gaseosas, líquidas y sólidas, y en un amplio rango de analitos, desde volátiles a no volátiles. Un extenso número de revisiones bibliográficas y libros recogen las aplicaciones de la SPME en diferentes tipos de matrices [1, 6-12].

Mecanismos de extracción

Existen dos tipos de mecanismos de extracción en función de los distintos sorbentes (adsorbentes/absorbentes) de SPME disponibles comercialmente, absorción y adsorción. Las fibras de polidimetilsiloxano (PDMS) y las de poliacrilato (PA) extraen los analitos por

absorción. El resto de sorbentes, incluyendo PDMS-DVB (divinilbenceno), Carbowax-DVB, Carbowax-TPR (plantilla de resina) y Carboxen-PDMS, son mezclas de capas, en las que la fase primaria de extracción es un sólido poroso y los analitos se extraen por adsorción.

Los fundamentos de la adsorción y absorción son diferentes. La Figura II.1.1 presenta los estados inicial y de equilibrio de ambos procesos de extracción. Independientemente de la naturaleza del sorbente, las moléculas de los analitos alcanzan su superficie. El hecho de que migren hacia el interior del sorbente o se queden en la superficie depende de la magnitud del coeficiente de difusión del analito en el sorbente. La difusión de las moléculas orgánicas en PDMS es relativamente rápida, por tanto la difusión en este sorbente se produce por absorción. Sin embargo, los coeficientes de difusión de las moléculas orgánicas en DVB y Carboxen son tan pequeños que, en el tiempo de análisis de la SPME, todas las moléculas permanecen en la superficie del sorbente. Estas moléculas orgánicas deberían permanecer en contacto con la capa durante un largo tiempo (días o semanas) para que difundieran hacia el interior del sorbente (distancias muy cortas). Esto se manifestaría durante el análisis en un persistente efecto memoria, difícil de eliminar incluso después de varias desorciones.

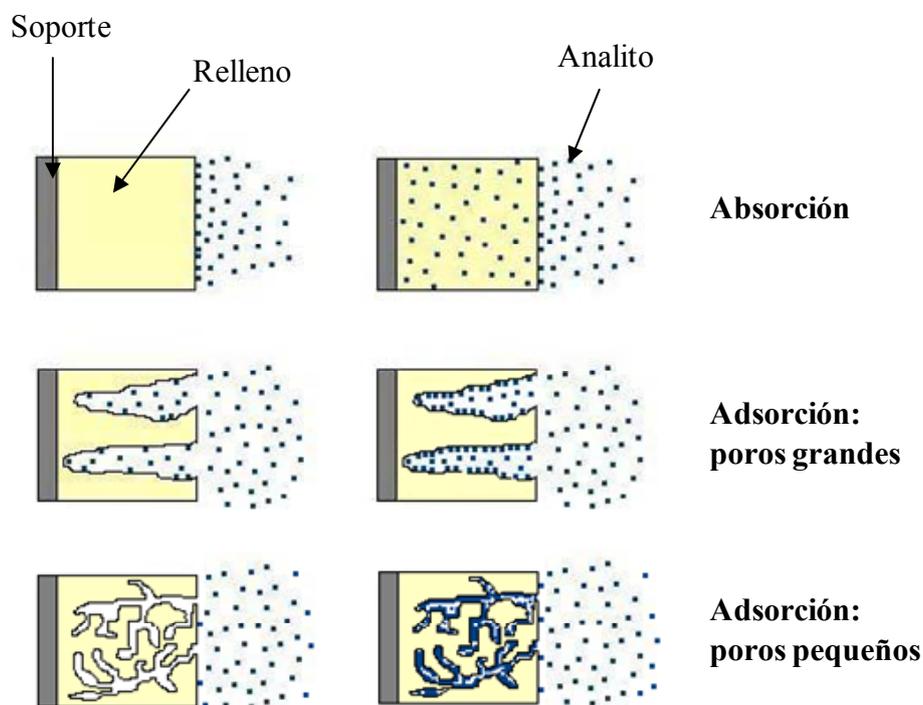


Figura II.1.1. Comparación de los mecanismos de extracción por absorción y adsorción

(a) Absorción

El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra, indica que existe una relación lineal entre el número de moles absorbidos sobre el sorbente (n) y la concentración de analito en la fase acuosa (C_0) [13], tal como se recoge en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_0 V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad (1)$$

donde K_{fs} es el coeficiente de partición entre el sorbente y la muestra, y V_f y V_s son los volúmenes de sorbente y de muestra, respectivamente. Si en la ecuación anterior se asume que generalmente el volumen del sorbente es mucho más pequeño que el de la muestra ($V_f \ll V_s$):

$$n = K_{fs}V_f C_0 \quad (2)$$

Esta aproximación no es válida en el caso de que los analitos tengan elevada afinidad por la fibra y se utilicen volúmenes de muestra pequeños.

El modelo matemático para la SPME cuando los analitos se extraen del espacio de cabeza tiene en cuenta una tercera fase gaseosa [14]. La cantidad de analito extraída en el sorbente está relacionada con el equilibrio de los analitos en las tres fases. La cantidad total de analito debe mantenerse constante durante la extracción:

$$C_0 V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3 \quad (3)$$

donde C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra acuosa; C_1^∞ , C_2^∞ y C_3^∞ son las concentraciones en el equilibrio del analito en el sorbente, en la disolución acuosa y en el espacio de cabeza, respectivamente; V_1 , V_2 , V_3 son los volúmenes de sorbente, de la disolución acuosa y del espacio de cabeza, respectivamente.

La cantidad de analito absorbida sobre el sorbente (n) puede expresarse como:

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K}{K V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (4)$$

Siendo,

$K_1 = C_1^\infty / C_3^\infty$, Coeficiente de partición sorbente/gas,

$K_2 = C_1^\infty / C_3^\infty$, Coeficiente de partición gas/agua,

K es el coeficiente de partición entre el sorbente y la disolución.

Para la mayoría de los analitos K_2 es relativamente pequeña y el muestreo en el espacio de cabeza no afectará la cantidad de analito retenida en el sorbente si el volumen del espacio de cabeza es mucho menor que el volumen de la disolución acuosa ($V_3 \ll V_2$). Asumiendo también que $V_1 \ll V_2$ resulta la expresión:

$$n = KV_1C_0 \quad (5)$$

Concluyendo, según las ecuaciones (2) y (5), que la cantidad de analito absorbida sobre el sorbente (n) depende de la concentración inicial en la muestra (C_0).

La cinética del proceso es otra cuestión a tener en cuenta en SPME. Los analitos deben transportarse desde la matriz de la muestra hasta el sorbente en el muestreo por inmersión, o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí a la fibra en el muestreo en espacio de cabeza. Algunos compuestos con elevado coeficiente de partición entre el sorbente y la fase acuosa requieren tiempos largos de muestreo. Esto es debido a que un gran número de moléculas de analito tienen que atravesar una capa estática de agua con un coeficiente de difusión muy bajo para llegar al sorbente. Esta limitación cinética se puede solucionar mediante técnicas de agitación eficaces como la sonicación. Los tiempos de muestreo pueden reducirse sustancialmente mediante el muestreo indirecto en el espacio de cabeza, ya que la difusión de los analitos en la fase gaseosa es cuatro órdenes de magnitud mayor que en la fase acuosa. El equilibrio entre la fase acuosa y la fase gaseosa se puede conseguir rápidamente mediante agitación constante de la muestra acuosa, de modo que continuamente se esté generando una superficie nueva. El muestreo en el espacio de cabeza permite aplicar la SPME a muestras con matrices más complejas [15].

(b) Adsorción

La adsorción es el otro proceso fisicoquímico de muestreo que se produce al utilizar fibras revestidas con fases sólidas porosas. En este proceso, se establece una competencia entre los analitos por los sitios disponibles en la fibra para la adsorción, ya que éstos son limitados. Por tanto, la relación entre la concentración de un analito en la muestra y la cantidad extraída con la fibra no mantiene la linealidad para un intervalo muy amplio de concentraciones.

El modelo matemático se desarrolló para las fibras PDMS-DVB, Carbowax-DVB y Carbowax-TPR [16]. La dependencia entre la concentración en el equilibrio de un analito asociado a un adsorbente y su concentración en disolución obedece a la isoterma de adsorción de Langmuir. En este modelo, el sorbente tiene un limitado número de sitios de adsorción. Se aplican las siguientes suposiciones:

- La molécula se adsorbe en un estado inmóvil.
- Todos los sitios son equivalentes.
- En cada sitio sólo se une una molécula.
- No hay interacciones entre las moléculas adsorbidas en sitios contiguos, es decir, la constante de equilibrio es independiente del número de moléculas adsorbidas.

La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

$$n = \frac{K_{fs}^D V_f C_o V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f \max} - C_f)} \quad (6)$$

donde K_{fs}^D es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_{f \max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que aparecen en la ecuación (1).

La SPME por adsorción también puede llevarse a cabo por inmersión directa de la fibra en la muestra como hemos visto anteriormente o por exposición de la fibra al espacio de cabeza. En el segundo tipo de muestreo el balance de masas tiene en cuenta las tres fases, como ya se vio en la ecuación (3). La concentración de analito en la fibra en el equilibrio (C_{fA}^∞) se determina aplicando el modelo de Langmuir y la concentración de analito en el espacio de cabeza de la muestra (C_{hA}^∞) se determina mediante la ley de Henry (K_{HA}). Sustituyendo ambas concentraciones en la ecuación (3) y se obtiene la cantidad de analito extraída con la fibra una vez alcanzado el equilibrio:

$$n = C_{fA}^\infty V_f = \frac{K'_A C_{oA} V_s V_f (C_{f \max} - C_{fA}^\infty)}{V_s + V_h K_{HA} + K'_A V_f (C_{f \max} - C_{fA}^\infty)} \quad (7)$$

donde V_h es el volumen del espacio de cabeza.

En el equilibrio, la cantidad de analito extraída del espacio de cabeza de la muestra puede ser igual o menor a la cantidad extraída directamente de la muestra. Por tanto, es obvio que la sensibilidad obtenida mediante el muestreo en espacio de cabeza será igual o menor a

la del muestreo directo. Para minimizar la pérdida de sensibilidad, el volumen del espacio de cabeza debe ser lo menor posible. Por otro lado, el muestreo en espacio de cabeza reduce los problemas relacionados con la matriz de la muestra, y además suele ser más rápido.

Para concentraciones muy bajas de analito sobre la fibra y analitos con baja afinidad por la fibra, se puede considerar $C_{f \max} \gg C_f$. De este modo se observaría una relación de dependencia lineal para la ecuación (6). Sin embargo, si la cantidad de analito sobre la fibra no es despreciable comparada con el total de sitios activos, la dependencia no puede considerarse lineal.

La cantidad de analito extraída de una muestra, que contiene más de un compuesto, será menor que n de la ecuación (6), ya que se reduce el número de sitios disponibles. Además como $C_{f \max}$ es menor para el analito, la no linealidad se hace significativa a concentraciones bajas si lo comparamos con el caso de que no existan compuestos interferentes. Estos efectos se minimizan si el compuesto interferente se encuentra a concentraciones muy bajas y si se caracteriza por tener baja afinidad por el sorbente.

Parámetros que afectan al proceso de extracción

(a) Recubrimientos

La eficiencia del proceso de extracción depende de la constante de distribución del analito entre el recubrimiento y la matriz de la muestra. En la Tabla II.1.1 se presentan los recubrimientos de fibras disponibles comercialmente, así como algunas de sus propiedades, usos y aplicaciones. Además de éstos, diversos autores han desarrollado métodos para preparar fibras que presentan propiedades específicas para la extracción de determinados analitos [2].

Tabla II.1.1. Recubrimientos de fibras comercialmente disponibles: usos, propiedades y aplicaciones.

Recubrimiento	Espesor capa (µm)	Polaridad	Descripción de la fase	T. máx. de trabajo (°C)	Técnica	Compuestos a analizar
PDMS	100	No polar	No enlazada	280	GC/HPLC	Volátiles
PDMS	30	No polar	No enlazada	280	GC/HPLC	No polares-semivolátiles
PDMS	7	No polar	Enlazada	340	GC/HPLC	Poco polares-semivolátiles
PDMS-DVB	65	Bipolar	Entrelazada	270	GC	Polares-volátiles
PDMS-DVB	60	Bipolar	Entrelazada	270	HPLC	General
PA	85	Polar	Entrelazada	320	GC/HPLC	Polares-semivolátiles
Carboxen-PDMS	75	Bipolar	Entrelazada	320	GC	Gases y volátiles
Carboxen-PDMS ^a	85	Bipolar	Entrelazada	320	GC	Gases y volátiles
Carbowax-DVB ^a	65	Polar	Entrelazada	265	GC	Polares
Carbowax-DVB	70	Polar	Entrelazada	265	GC	Polares
Carbowax-TPR	50	Polar	Entrelazada	240	HPLC	Tensioactivos
DVB-PDMS-Carboxen	50/30	Bipolar	Entrelazada	270	GC	Volátiles

^aTipo Stableflex se encuentra sobre una fibra de 2 cm de longitud.

GC: Cromatografía de gases

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia.

Las fases estacionarias están inmovilizadas sin enlaces, o bien están parcialmente o muy entrelazadas. Las fases no enlazadas son estables en algunos disolventes orgánicos miscibles con agua; sin embargo puede producirse una ligera dilatación si se usa con disolventes no polares. Las fases enlazadas son compatibles con la mayoría de los disolventes orgánicos excepto con los no polares. Las fases parcialmente entrelazadas son estables en la mayoría de los disolventes miscibles en agua. Las fases muy entrelazadas son equivalentes a las parcialmente entrelazadas, excepto en que tienen algunos enlaces con el centro de la fibra [17].

Algunas fases se comercializan con espesores diferentes (PDMS 7, 30 y 100 μm) y esto afecta tanto al tiempo de equilibrio como a la sensibilidad del método. El uso de una fibra gruesa requiere un tiempo de extracción más largo pero las recuperaciones son generalmente mayores.

La naturaleza química de los analitos determina el tipo de polímero utilizado en la extracción. No obstante, la selección del recubrimiento está basada principalmente en la polaridad y volatilidad de los compuestos traza. Como primera consideración, la regla simple “similar disuelve a similar” se puede aplicar a recubrimientos poliméricos. Por otra parte, la constante de distribución de los analitos y el grosor del recubrimiento influye en la sensibilidad del método. Por tanto, la elección del recubrimiento es un paso delicado a la hora de desarrollar un método por SPME.

(b) Modo de extracción

La selección del modo de extracción directa está basada en la consideración de la composición de la matriz de la muestra y la volatilidad de los analitos. Generalmente, para matrices no homogéneas, incompatibilidades de pH o de polaridad, la única elección es el espacio de cabeza. En cambio, si se trata de muestras relativamente “limpias”, podemos utilizar el modo directo de extracción.

(c) Volumen de muestra

El volumen de la muestra es un parámetro importante a optimizar en SPME, debido a que está directamente relacionado con la sensibilidad del método. El volumen de muestra es

normalmente mucho mayor que el volumen de la fibra, y la cantidad de analito extraída es sólo proporcional al coeficiente de partición (K_{fs}), a la concentración de analito en la muestra y al volumen de la fibra. El coeficiente de partición de los analitos entre la matriz de la muestra y la fibra debería ser considerado, debido a que los compuestos con grandes K_{fs} no cumplen esta aproximación y están más afectados por los cambios en el volumen de la muestra que los compuestos con pequeña afinidad por la fibra. Por esta razón, un buen criterio para elegir el mejor volumen de muestra tendría que considerar el valor de K_{fs} .

(d) Tiempo del proceso de extracción

Para optimizar el análisis mediante SPME se debe permitir que el analito alcance el equilibrio entre la muestra y el recubrimiento de la fibra. El *tiempo de equilibrio* se define como el tiempo después del cual la cantidad de analito extraído permanece constante y se corresponde con la cantidad de analito extraído en un tiempo infinito.

Debido a que la SPME es un proceso basado en el equilibrio de distribución, en el tiempo de equilibrio se deberá extraer la mayor cantidad de analito. Agitando la muestra se reduce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, debido a que así se favorece la difusión de los analitos hacia la fibra. Los compuestos con bajas constantes de distribución tienen tiempos de equilibrio elevados, y por lo tanto, para estos compuestos se suele seleccionar un tiempo de extracción menor que el tiempo de equilibrio. En este caso, el tiempo de exposición debe ser controlado muy bien para asegurar unos datos reproducibles.

Los inyectores automáticos de muestra pueden ajustar el tiempo de extracción de manera muy reproducible y, en consecuencia, la precisión de la determinación del analito puede ser entonces muy buena, incluso cuando en el sistema no se haya alcanzado el equilibrio. No obstante, esto requiere que las condiciones de transferencia de masa y la temperatura se mantengan constantes durante todo el experimento.

(e) Temperatura del proceso de extracción

La temperatura de extracción tiene dos efectos opuestos en el proceso de SPME. Un incremento en la temperatura durante la extracción favorece la difusión de los analitos hacia la fibra. En el modo de extracción en espacio de cabeza, la temperatura ayuda a la transferencia de los analitos al espacio de cabeza. Por otra parte, este incremento en la

temperatura reduce la constante de distribución de los analitos debido a que el paso de absorción es un proceso exotérmico.

(f) Modificación del pH y adición de una sal

Una forma de incrementar la cantidad de algunos analitos retenidos en el recubrimiento de la fibra viene dada por un ajuste de pH [18]. El pH de la muestra puede ser ajustado a aquellos valores en los cuales se obtenga la forma neutra en la extracción de analitos ácidos o básicos.

Muchos estudios [18] han mostrado que por la adición de una sal, normalmente cloruro, la retención de los analitos en el recubrimiento de la fibra se suele mejorar. Este efecto se asocia a un incremento de la fuerza iónica de la muestra. Esto reduce la solubilidad de los analitos, los cuales se retienen más fácilmente. Este efecto no es general y depende de la polaridad del analito, concentración de la sal y naturaleza de la matriz de la muestra.

(g) Adición de disolventes orgánicos

Se sabe que la presencia de disolventes orgánicos en muestras acuosas normalmente reduce la cantidad de analito extraído, aunque este hecho no se ha investigado en profundidad [19].

(h) Agitación de la muestra

Como se ha comentado anteriormente, al agitar la muestra se favorece la difusión de los analitos hacia el recubrimiento de la fibra, y se reduce el tiempo de extracción tanto en la extracción directa como en la de espacio de cabeza.

La agitación magnética es el tipo de agitación más utilizado. Otras técnicas de agitación alternativas, son la agitación por ultrasonidos y la agitación por ultrasonidos intrusiva, que también mejoran los tiempos de extracción.

(i) Efectos de la matriz

Algunos autores han investigado los efectos de la matriz en la eficiencia de la extracción de los analitos [18]. La materia orgánica presente en muestras acuosas reales puede reducir la cantidad de analito extraído, dando lugar a la interacción entre la materia orgánica disuelta y los analitos.

II.1.2 Acoplamiento de SPME con técnicas de separación

El proceso de SPME consta de dos etapas. La primera etapa es la extracción con una fibra recubierta del sorbente que se pone en contacto con la muestra o su espacio de cabeza durante un tiempo determinado a una temperatura controlada.

La segunda etapa consiste en la desorción de los analitos retenidos en la fibra. Esta etapa depende de la técnica analítica que se vaya a utilizar a continuación. La SPME directa y en espacio de cabeza puede acoplarse a la cromatografía líquida (LC) o a la cromatografía de gases (GC). Si se emplea la LC para llevar a cabo el análisis, la desorción se realiza empleando algún disolvente orgánico, mientras que en GC la desorción es térmica.

El tiempo y la temperatura de desorción han de ser optimizados ya que hay compuestos que pueden permanecer retenidos en el recubrimiento de la fibra y aparecer en subsiguientes análisis (efecto memoria). La utilización de tiempos de desorción elevados puede ayudar a reducir este efecto.

Acoplamiento SPME-GC

En la mayor parte de las aplicaciones de la SPME descritas hasta este momento para el análisis de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles, esta técnica es acoplada a la cromatografía de gases [20].

La etapa de desorción se realiza térmicamente [21] como se ha comentado, ya que con la temperatura los compuestos disminuyen su afinidad por la fibra, y los analitos son introducidos en la columna analítica por el gas portador. En la Figura II.1.2 se presenta un esquema del acoplamiento SPME-GC.

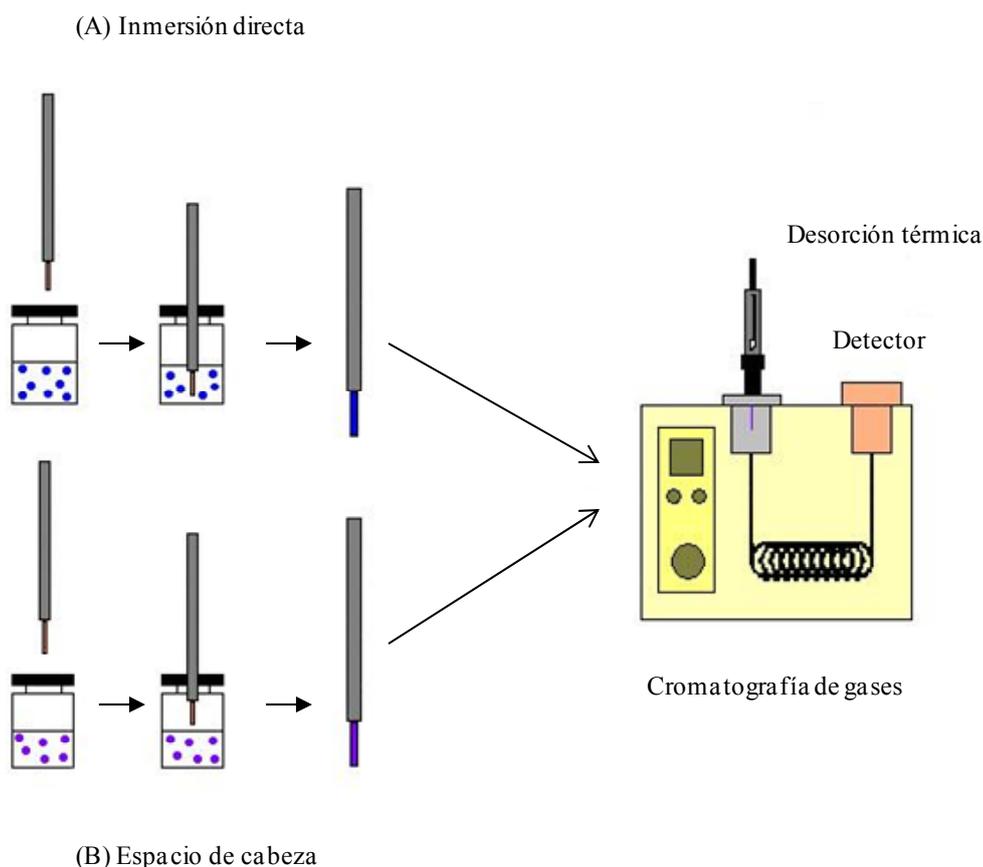


Figura II.1.2. Esquema del proceso de SPME acoplada a GC. (A) inmersión directa y (B) espacio de cabeza.

Acoplamiento SPME-LC

Una de las principales dificultades que conlleva el acoplamiento SPME-LC es la ausencia de una fase adecuada, que tenga no solamente elevada capacidad de extracción de los analitos, sino que también sea estable en disoluciones con diferentes matrices. Las fases comerciales son poco polares y algunos analitos presentan interacciones fuertes con el agua. Por tanto en el desarrollo de la SPME la extracción de los analitos polares e iónicos de las muestras de agua se ha convertido en un reto. Una solución para mejorar la capacidad de extracción de dichos analitos es convertirlos en formas menos polares o no ionizadas mediante el ajuste del pH o mediante derivatización. Otra solución consiste en el desarrollo de nuevos materiales polares y de intercambio iónico.

La desorción se basa en el uso de un disolvente. Este tipo de desorción es adecuado para analitos térmicamente inestables o poco volátiles. Puede llevarse a cabo fuera de línea,

introduciendo la fibra con los analitos retenidos en un vial que contenga el disolvente, y a continuación una alícuota de este disolvente es inyectada en el cromatógrafo de líquidos. También puede realizarse en línea, utilizando una interfaz con una cámara de desorción. En este caso, si la desorción se lleva a cabo con la fase móvil, se denomina desorción “dinámica” [22] y los analitos son desorbidos al mismo tiempo que son arrastrados hacia la columna analítica. Sin embargo, si se introduce un disolvente adecuado en la cámara de desorción y, a continuación, se introduce la fibra durante un tiempo determinado, se habla de desorción “estática” [23, 24]. En la Figura II.1.3 se puede observar el esquema correspondiente a este acoplamiento.

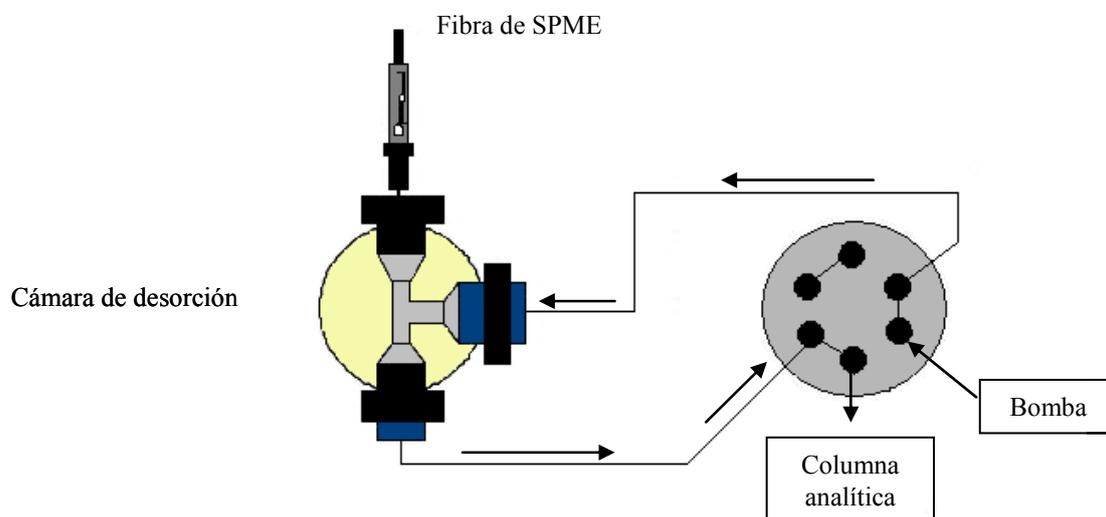


Figura II.1.3. Esquema del acoplamiento SPME-Cromatografía Líquida.

Acoplamiento SPME-CE

También se han publicado diversos trabajos en los que la SPME se combina con la electroforesis capilar (CE) [25]. Si se combina fuera de línea, la única diferencia respecto al acoplamiento SPME-LC es la etapa de desorción. En esta combinación, la desorción consiste en introducir la fibra con los analitos retenidos en el interior de un capilar que contenga unos mililitros de disolvente orgánico, de modo que tras la desorción de los analitos se lleve a cabo la inyección hidrodinámica o electrocinética en el capilar de CE. Entre los inconvenientes del procedimiento hay que destacar el bajo factor de preconcentración, ya que sólo una pequeña

parte de los analitos desorbidos son inyectados en el equipo de CE. Si la SPME y la CE se combinan en línea, la desorción se lleva a cabo utilizando una interfaz que permita conectar la fibra con el extremo del capilar de CE. Sin embargo, el diseño de esta interfaz es difícil porque el volumen de inyección en CE es del orden de nanolitros.

II.1.3 Objeto del trabajo

El objetivo central del trabajo que se agrupa en este Capítulo se ha orientado al establecimiento de nuevas metodologías analíticas, basadas en la SPME acoplada a la cromatografía líquida, para la determinación AHs en alimentos procesados a alta temperatura.

Para alcanzar este objetivo central se introducen otros, de carácter parcial, como los que se incluyen a continuación:

- Establecer las condiciones experimentales adecuadas para la determinación de AHs por HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica. En el caso de la detección electroquímica, la atención se centrará en establecer las condiciones cromatográficas que nos permitan la separación de las AHs, tanto polares como no polares, en un solo cromatograma, con la consiguiente reducción del tiempo requerido para llevar a cabo el análisis cromatográfico.
- El estudio del comportamiento y optimización de las variables experimentales que afectan a los procesos de absorción/desorción relacionados con los métodos SPME-HPLC: tipo de recubrimiento de la fibra SPME, tiempo de absorción, disolvente y modo de desorción. El uso de diseños factoriales, para encontrar los valores más adecuados de las variables, permitirá una consideración global de los experimentos a realizar y de las posibles interacciones entre las variables.
- La optimización de métodos de análisis cuantitativos para la determinación por HPLC, después de la separación de los analitos por SPME, con el uso de detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica, que permitan la cuantificación de las AHs contenidas en alimentos a concentraciones del orden de ng g^{-1} .
- La aplicación de la SPME a la determinación de compuestos poco volátiles como las AHs presentes en muestras sólidas, requiere un proceso de solubilización previo en un medio acuoso o acuo-orgánico. En ese sentido, es necesario establecer y optimizar las

condiciones apropiadas para la solubilización de AHs contenidas en extractos de carne, como paso previo en su determinación por SPME-HPLC. Con objeto de disminuir los lo tiempos requeridos para llevar a cabo la solubilización, se aplicarán las técnicas de ultrasonidos y microondas focalizadas.

- Determinar las eficiencias de recuperación y el contenido de AHs en muestras de extractos de carne de distinta naturaleza, haciendo uso de las distintas metodologías SPME-HPLC establecidas.

II.2 Determinación de Aminas Heterocíclicas utilizando microextracción en fase sólida acoplada a HPLC con detección Vis-UV

II.2.1 Separación cromatográfica

Tal como se expuso en la Introducción de esta Tesis, entre las técnicas más frecuentemente empleadas para la determinación de AHs, destaca la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), utilizando detectores Vis-UV o de fluorescencia. Por ello, esta técnica se ha escogido en este trabajo para separar las aminas heterocíclicas. Como sistema de detección se eligió la absorción Vis-UV utilizando un detector de diodos en serie (DAD), ya que permite la confirmación del pico cromatográfico mediante la comparación de su espectro Vis-UV con el correspondiente a un estándar.

Las condiciones cromatográficas más utilizadas para la separación de las AHs consiste en una fase estacionaria C_{18} , con un tratamiento especial de desactivación de los grupos silanol, y la separación se produce mediante un gradiente ternario basado en dos disoluciones de trietilamina (TEA) 10 mM a diferente pH y acetonitrilo como modificador orgánico [26-28]. El ácido fosfórico se usa tradicionalmente para regular el pH de las fases móviles utilizadas en el análisis por HPLC con detección Vis-UV de las AHs, dada la baja absorbancia de este ácido, lo que contribuye a la obtención de una línea base estable. A fin de obtener picos cromatográficos simétricos y estrechos, para compuestos básicos como las AHs, se usa trietilamina como aditivo a la fase móvil, para enmascarar los grupos silanol libres de la fase estacionaria.

Atendiendo a lo expuesto, se estudiaron diferentes modificaciones, tanto del pH como de la programación del gradiente, y se establecieron las condiciones experimentales adecuadas para la determinación por HPLC de un grupo de 10 AHs (IQ, MeIQ, MeIQx, NH, H, Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, A α C y MeA α C), haciendo uso de un gradiente con una fase móvil ternaria TEA/fosfórico a pH 3.2 (A) – acetonitrilo (B) - TEA/fosfórico a pH 3.6 (C), y de una fase estacionaria de C_{18} (TSK-Gel ODS-80TM). El gradiente propuesto es el siguiente, manteniendo el flujo a $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$: 5-12% de B en A desde 0 a 8.40 minutos; 12-25% de B en

C, desde 8.41 a 20 minutos; 25-50% de B en C, desde 20.1 a 31.30 minutos y 50% de B en A en el minuto 31.31; volviendo a las condiciones iniciales en 5 minutos y manteniéndose el sistema en estas condiciones durante 5 minutos más para su estabilización.

La Figura II.2.1 muestra un cromatograma representativo obtenido usando el programa de longitudes de onda recogido en el apartado IV.3.1 de la Parte Experimental y en las condiciones indicadas anteriormente, donde puede observarse una aceptable separación entre todos los compuestos. Por otra parte, los estudios de reproducibilidad muestran que los tiempos de retención de las distintas aminas, presentan desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0.60 y 2.2%.

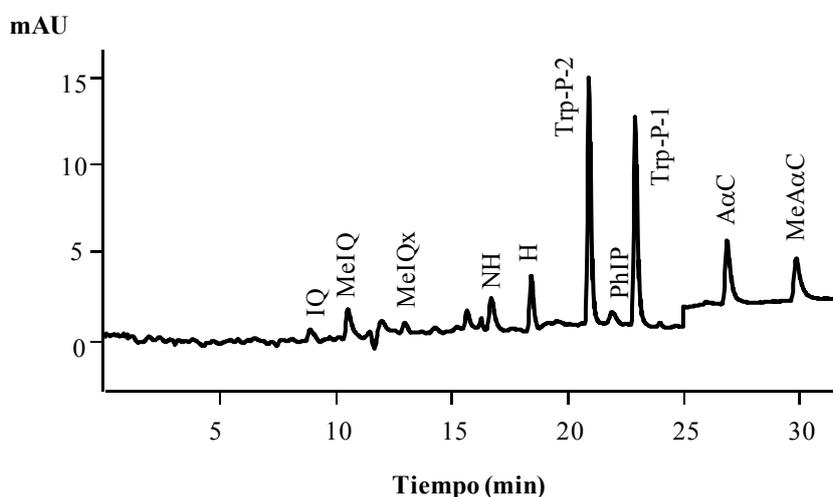


Figura II.2.1. Cromatograma correspondiente a una disolución de AHs con detección Vis-UV.

II.2.2 *Microextracción en fase sólida de AHs*

Como se ha comentado en la Introducción a este Capítulo, el método SPME-HPLC comprende dos pasos: en primer lugar, se realiza la extracción de los analitos desde la matriz de la muestra y seguidamente se lleva a cabo la desorción de los analitos en el sistema cromatográfico. En este sentido es necesario llevar a cabo la optimización de aquellos parámetros que afectan tanto al proceso de extracción (tipo de recubrimiento de la fibra SPME y tiempo de extracción) como al proceso de desorción (disolvente y tiempo de desorción).

Evaluación del recubrimiento de la fibra SPME

La eficiencia del proceso de extracción depende de la constante de distribución del analito entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra. En ese sentido, las características de la fibra empleada pueden afectar a la retención de los analitos presentes en la muestra.

Entre las fibras SPME disponibles comercialmente, se han seleccionado tres fibras con recubrimientos de diferente polaridad y espesor: Carbowax-Templated Resin de 50 μm (CW-TPR), Poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno de 60 μm (PDMS-DVB) y Poliacrilato de 85 μm (PA). Los recubrimientos seleccionados muestran el siguiente orden de polaridad: CW-TPR > PDMS-DVB > PA.

Para seleccionar el mejor recubrimiento se llevaron a cabo extracciones durante 60 min, seguida de una desorción en modo estático, sumergiéndose la fibra en la cámara de desorción, llena con la fase móvil inicial, durante 10 min. Las eficiencias de extracción obtenidas a partir de estas experiencias se muestran en la Tabla II.2.1. Estos resultados reflejan que la fibra más polar, la CW-TPR, exhibía las mejores eficiencias de extracción para todas las amines, excepto para NH. Por otra parte, la fibra menos polar, la PA, mostraba las menores eficiencias de extracción para la mayoría de los analitos.

Los resultados obtenidos demuestran que las tres fibras estudiadas son capaces de extraer las AHs, pero la mayor eficiencia de extracción se obtiene con el recubrimiento CW-TPR. Las eficiencias de extracción relativas de CW-TPR/PDMS-DVB y CW-TPR/PA, calculadas como relaciones de área de pico, presentan valores máximos de 9.5 y 6.4, respectivamente. En atención a los resultados obtenidos, para los estudios posteriores se seleccionó la fibra SPME con el recubrimiento de CW-TPR.

Tabla II.2.1. Eficiencias de extracción (expresadas como áreas de pico) obtenidas con los tres recubrimientos estudiados.

Compuesto	CW-TPR	PDMS-DVB	PA
IQ	60.9	13.8	14.5
MeIQ	99.4	29.5	24.1
MeIQx	29.0	-	11.2
NH	409	491	104
H	323	224	50.3
Trp-P-2	3022	318	635
Trp-P-1	3333	486	1050
AαC	1241	372	299
MeAαC	2128	846	540

Proceso de absorción

Puesto que la microextracción en fase sólida es un proceso de equilibrio, en el que los analitos se distribuyen entre la matriz de la muestra y la fase polimérica de la fibra, es necesario determinar el tiempo requerido para que cada uno de los analitos alcance el equilibrio. Este tiempo, denominado tiempo de equilibrio, determina la máxima cantidad de analito que puede ser extraída por la fibra y, por tanto, es un parámetro que ejerce una influencia directa en la sensibilidad del método analítico.

Los perfiles correspondientes a los tiempos de extracción se establecieron por medida de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada amina como una función del tiempo de exposición. La fibra se pone en contacto con disoluciones patrón de las aminas, a una concentración de 520 ng mL⁻¹, variando el tiempo de extracción entre 2 y 60 min. Todas las extracciones se realizaron a temperatura ambiente y con agitación de la disolución.

La Figura II.2.2 muestra los perfiles correspondientes a los tiempos de extracción para las AHs estudiadas haciendo uso de la fibra CW-TPR. Los resultados obtenidos muestran que los equilibrios dependen del compuesto extraído y varían significativamente para las distintas

aminas. AHs polares como IQ, MeIQ y MeIQx alcanzaron el equilibrio muy rápidamente, H y NH tardaron unos 10 min, mientras que las otras aminos no polares, requieren tiempos superiores, no llegándose a alcanzar el equilibrio para algunas de ellas en los tiempos de extracción máximos considerados.

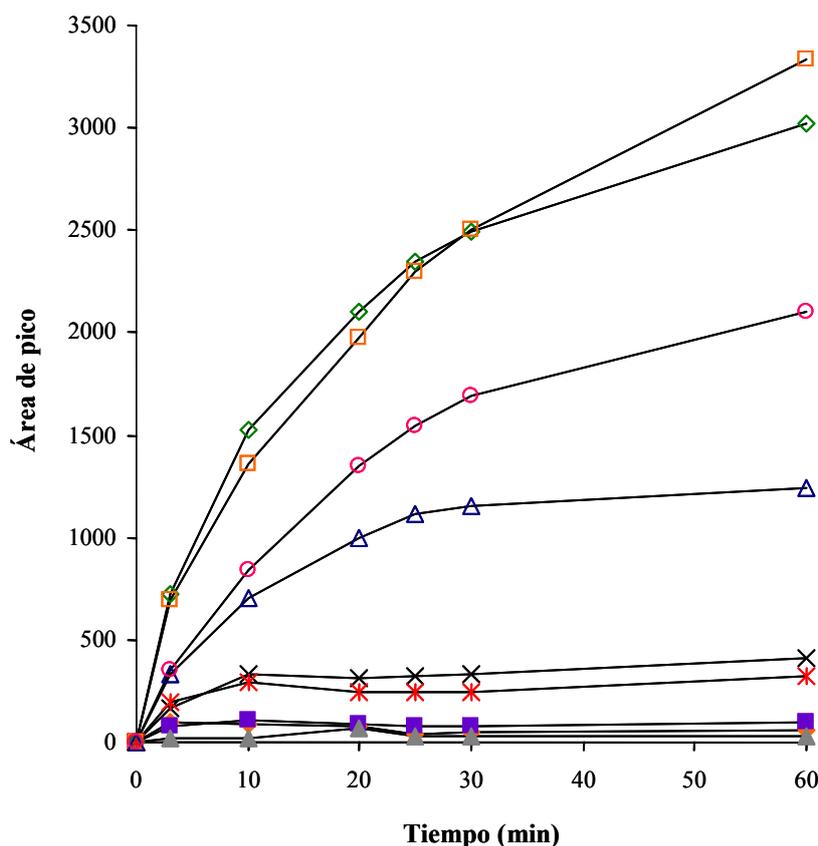


Figura II.2.2. Perfiles de los tiempos de extracción para las diferentes aminos utilizando la fibra de CW-TPR. IQ (◆), MeIQ (■), MeIQx (▲), NH (×), H (*), Trp-P-2 (◇), Trp-P-1 (□), AαC (△) y MeAαC (○).

En atención a la relación lineal existente entre la cantidad de analito retenida en la fibra y su concentración inicial en la muestra, es posible utilizar tiempos de extracción inferiores a los necesarios para alcanzar el equilibrio. En estos casos, para seleccionar los tiempos de extracción se tienen en cuenta los límites de detección requeridos para el análisis de los analitos que se consideren.

Proceso de desorción

Después de la inmersión de la fibra en la muestra objeto de análisis, durante el tiempo de extracción seleccionado, la fibra se introduce en la interfaz SPME-HPLC para su desorción. El proceso de desorción es extremadamente importante en SPME-HPLC, debiendo optimizarse el modo de desorción, estático o dinámico, y el disolvente usado.

En primer lugar seleccionaremos el modo de desorción, y para ello se utilizaron disoluciones acuosas con una concentración de 520 ng mL^{-1} de cada AHs. En el modo dinámico, la fibra se sumerge en la cámara de desorción que contiene la fase móvil inicial (TEA/fosfórico a pH 3.2:acetonitrilo, 95:5) y la válvula se pasa inmediatamente de la posición *load* a la posición *inject*. Después de 5 minutos, la válvula se vuelve a la posición *load* y la fibra se retira de la cámara de desorción. En el modo estático, la fibra se sumerge en la cámara de desorción llena de la fase móvil inicial durante 10 minutos (tiempo de inmersión), después del cual la válvula se pasa a la posición de *inject* y, después de 1 minuto (tiempo de desorción), la válvula se vuelve a la posición *load*, retirándose la fibra de la cámara de desorción. La Figura II.2.3 muestra las áreas obtenidas con ambos modos de desorción para las AHs estudiadas. En general, los resultados son mejores para todos los compuestos en el modo estático, seleccionándose como modo de desorción en el resto del trabajo experimental.

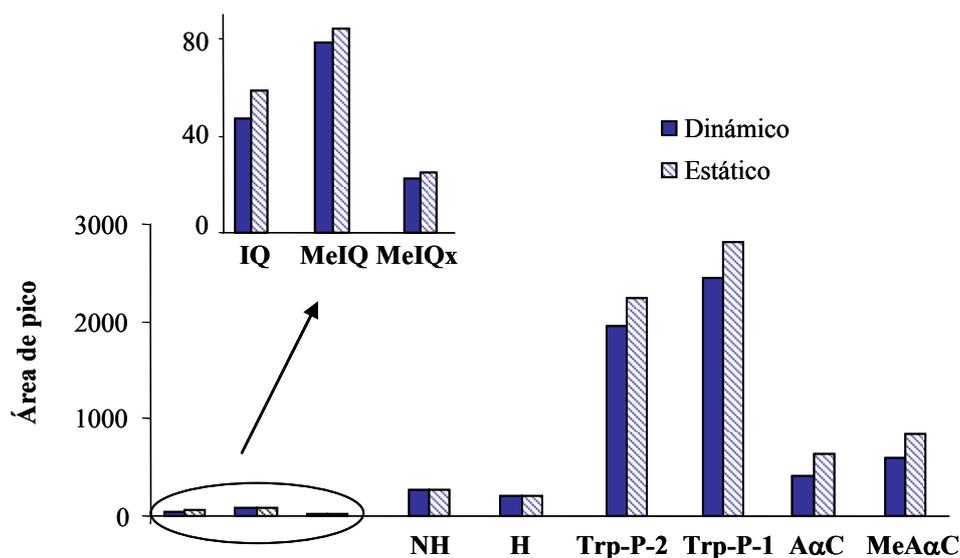


Figura II.2.3. Áreas obtenidas para las aminas con los modos de desorción estático y dinámico.

La composición del disolvente de desorción es el otro parámetro que se debe estudiar a la hora de optimizar una metodología basada en la SPME-HPLC. Teniendo en cuenta la naturaleza de los analitos a estudiar, se escogieron el metanol y la fase móvil inicial como posibles disolventes de desorción. En la Figura II.2.4 se muestra la variación en las áreas de los picos cromatográficos de las AHs cuando se emplean estos dos disolventes de desorción.

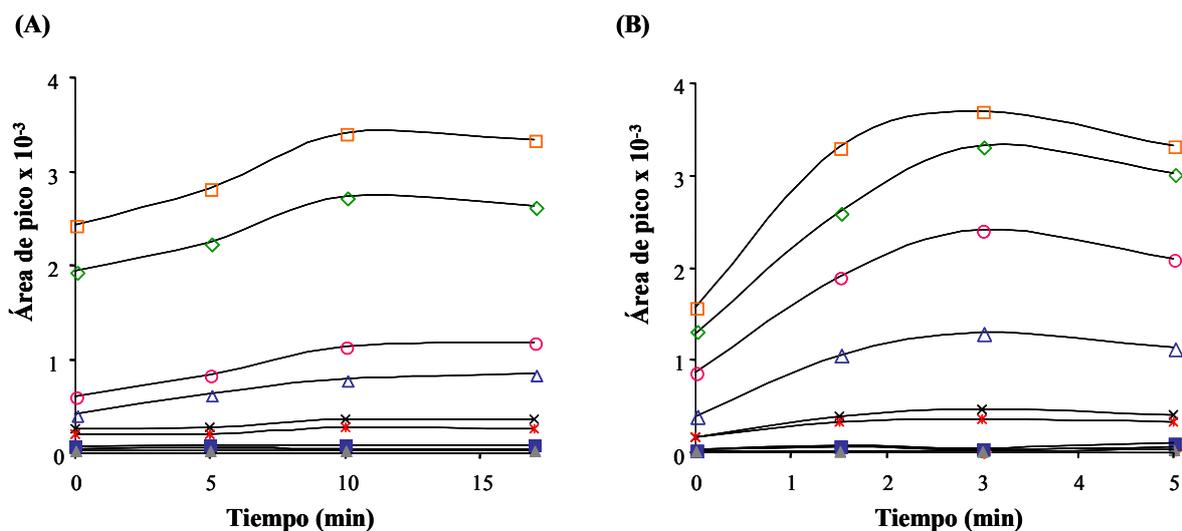


Figura II.2.4. Efecto del tiempo de desorción utilizando la fase móvil (A) y metanol (B) como disolventes de desorción en modo estática. IQ (\blacklozenge), MeIQ (\blacksquare), MeIQx (\blacktriangle), NH (\times), H ($*$), Trp-P-2 (\blacklozenge), Trp-P-1 (\square), A α C (\triangle) y MeA α C (\circ).

Como puede observarse, en todos los casos las áreas de los picos aumentan cuando lo hace el tiempo de desorción, especialmente cuando el disolvente es el metanol y el tiempo varía entre 0 y 3 minutos. Sin embargo, cuando se utiliza la fase móvil inicial como disolvente de desorción, los tiempos requeridos son superiores. No obstante, la desorción de las AHs polares está favorecida cuando utilizamos la fase móvil inicial como disolvente. Así, y teniendo en cuenta que debemos favorecer la desorción de estas aminas, las consiguientes ventajas prácticas y el efecto negativo del metanol sobre algunos recubrimientos, seleccionamos la fase móvil como disolvente de desorción.

En el proceso de desorción, se ha de considerar la existencia de compuestos que pueden permanecer retenidos en el recubrimiento de la fibra y aparecer en subsiguientes análisis (efecto memoria). Debido a que la SPME es un método de equilibrio, este efecto no es tan importante como en otros métodos. Sin embargo, puede llegar a ser un problema

cuando la concentración del analito en la muestra siguiente sea muy baja, con lo cual dicho efecto puede producir una interferencia importante.

Para determinar el efecto memoria de las aminas heterocíclicas utilizando la fibra CW-TPR, se realizó un estudio que consistía en sucesivos lavados de la cámara de desorción y la fibra con porciones de 250 μL de una mezcla de fase móvil (TEA/fosfórico a pH 3.6:acetonitrilo, 50:50), que favorezca la desorción de las AHs menos polares. Cada lavado se sigue de una desorción en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los resultados, calculados como porcentajes de área de pico inicial, pusieron de manifiesto que después de cuatro lavados: MeIQx, Trp-P-1 y A α C mostraron un efecto memoria menor del 1%; para las aminas IQ, H, Trp-P-2 y MeA α C el efecto oscilaba entre el 1 y 5% y, en el caso de MeIQ, NH y PhIP, alcanzaba un rango comprendido entre el 5 y el 15%. Sin embargo, después de seis lavados, el efecto memoria resultó ser despreciable, al ser inferior al 0.1% del área de pico inicial [29].

De acuerdo con los resultados obtenidos, es recomendable que la fibra y la cámara de desorción se laven 6 veces con porciones de 250 μL de fase móvil para minimizar el efecto memoria. Esta rutina también reduciría el efecto memoria de la interfaz, que podría convertirse en un problema significativo.

II.2.3 Optimización del método SPME-HPLC por Diseños Experimentales

El uso de un diseño factorial para encontrar los valores más adecuados de las variables que afectan a la microextracción en fase sólida acoplada a HPLC, permite una consideración global del número de experimentos a realizar, y de los posibles efectos de interacción entre las variables seleccionadas. La aplicación de una aproximación estadística, como es el diseño factorial, permite disminuir el tiempo de puesta a punto del método, así como proporcionar datos menos ambiguos.

Atendiendo a lo expuesto en los apartados anteriores, se sometieron a estudio las variables tiempo de absorción, tiempo de inmersión y tiempo de desorción, con objeto de obtener los valores óptimos, es decir, que conduzcan a recuperaciones máximas para cada compuesto.

Como primera aproximación a la obtención de una superficie de respuesta representativa del proceso SPME-HPLC, se utilizó un diseño factorial completo de dos niveles, 2^3 , dando lugar a 8 experiencias. Los diseños factoriales de dos niveles dan lugar a relativamente pocas experiencias para cada variable y, a diferencia de las opciones del estudio de una sola variable cada vez, permiten la detección y la evaluación de las posibles interacciones entre variables, cuando los efectos de las mismas no muestran aditividad.

Los factores estudiados, su codificación, así como los valores mínimos (-) y máximos (+) utilizados en el diseño, se muestran en la Tabla II.2.2. El resto de variables implicadas en el proceso se mantuvieron constantes: pH de la muestra (7) y porcentaje de metanol en la muestra (0.6%).

Tabla II.2.2. Niveles de los factores en el diseño previo.

Factor	Clave	Menor (-)	Mayor (+)
Tiempo de absorción, t_{abs} (min)	A	10	45
Tiempo de inmersión, t_{imm} (min)	B	3	10
Tiempo de desorción, t_{des} (min)	C	0.5	5

La Tabla II.2.3 muestra la matriz del diseño experimental, el orden del listado indica, exclusivamente, el orden, escogido al azar, en que los tratamientos experimentales se llevaron a cabo. Las respuestas elementales obtenidas para cada amina, expresadas por las áreas de pico cromatográfico, se muestran en la Figura II.2.5.

Las aminas estudiadas pueden clasificarse en dos grupos atendiendo a su comportamiento frente a los tres factores considerados. Un grupo constituido por las aminas polares (IQ, MeIQ y MeIQx) y el otro por aminas no polares (Trp-P-2, Trp-P-1, A α C y MeA α C). H y NH muestran un comportamiento particular, aunque similar al de las aminas polares, por lo que se han incluido en ese grupo.

Tabla II.2.3. Matriz del diseño factorial (2^3)

Experiencia	t_{abs}	t_{imm}	t_{des}
1	10	3	5
2	45	10	5
3	45	3	0.5
4	10	10	0.5
5	45	3	5
6	10	3	0.5
7	10	10	5
8	45	10	0.5

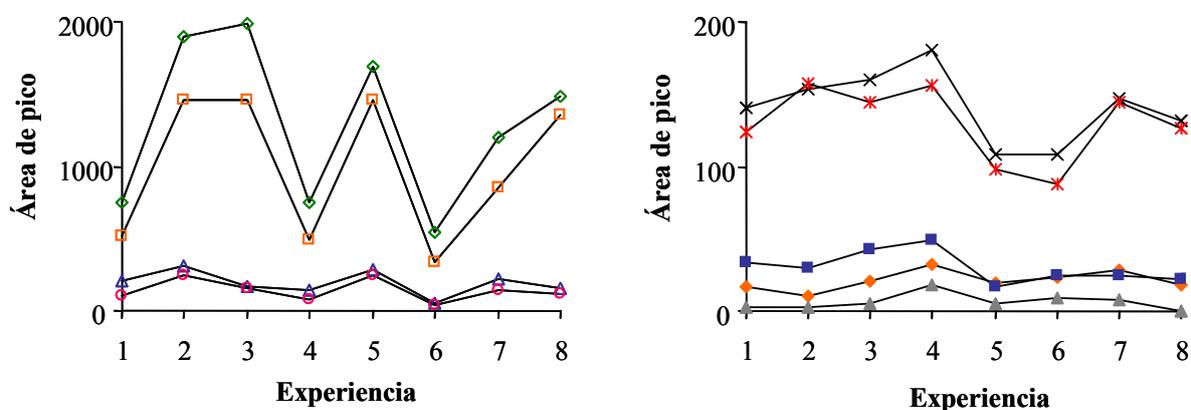


Figura II.2.5. Resultados obtenidos en cada experiencia del diseño factorial (2^3) para los compuestos estudiados. IQ (◆), MeIQ (■), MeIQx (▲), NH (×), H (*), Trp-P-2 (◇), Trp-P-1 (□), AαC (△) y MeAαC (○).

Los efectos de los factores principales, mostrados en la Figura II.2.6, ponen de manifiesto que, para las aminas polares, el tiempo de absorción y el tiempo de desorción tienen un efecto negativo en la respuesta, mientras que el tiempo de inmersión tiene un efecto positivo. Sin embargo, en el caso de las aminas menos polares, todos los factores tienen un efecto positivo. La Figura II.2.7 muestra la interacción entre los factores. Como puede verse, hay una interacción entre el tiempo de absorción y el tiempo de inmersión para ambos grupos. Para las aminas polares, la respuesta alcanza el máximo valor cuando el tiempo de absorción está en su nivel más bajo y el tiempo de inmersión en su nivel más alto. Sin embargo, para las aminas menos polares, la respuesta alcanza el máximo para los valores más altos del tiempo de absorción y su interacción con el tiempo de inmersión es menos significativa.

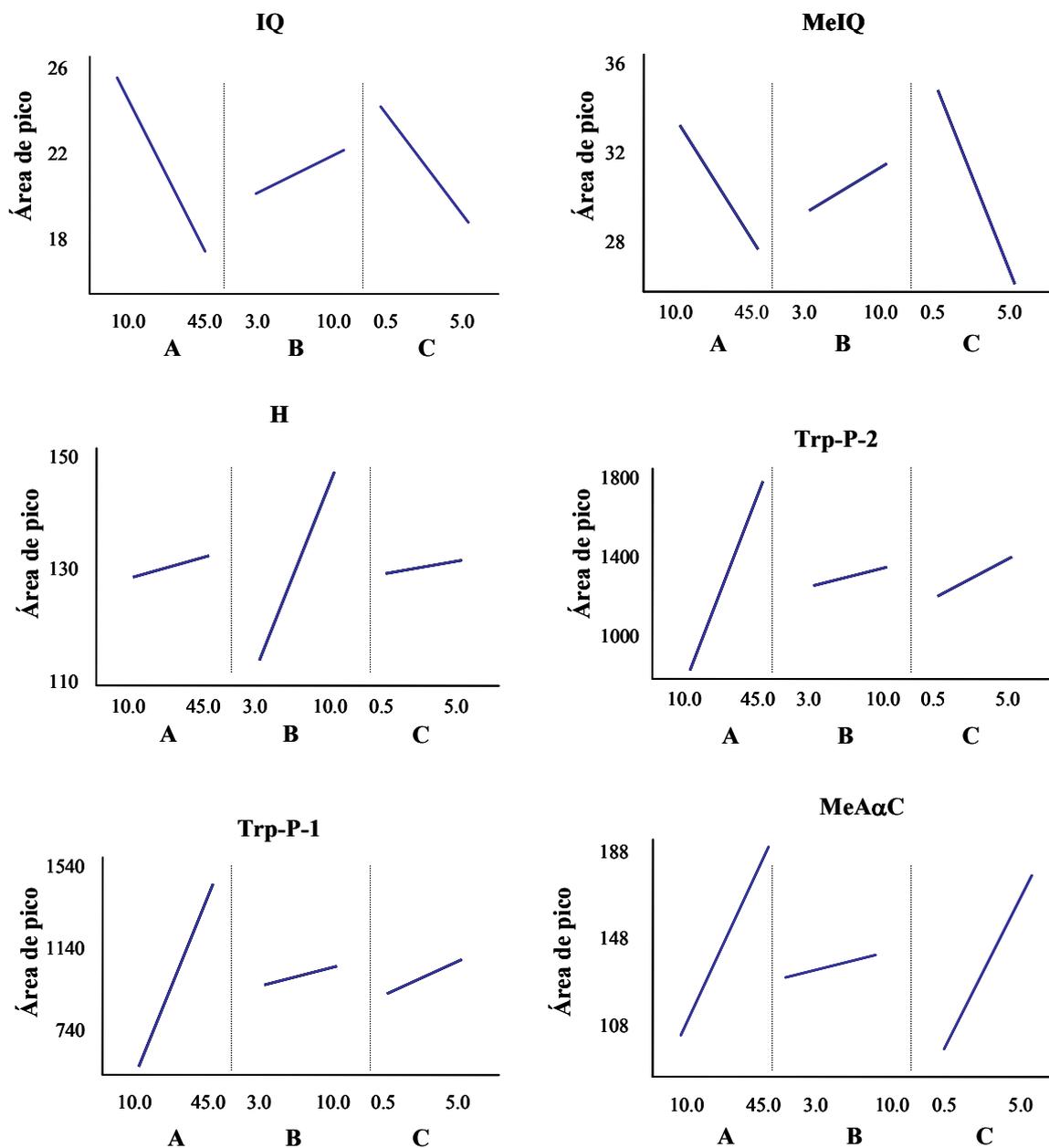


Figura II.2.6. Efectos de los factores principales para algunas aminas representativas, donde: A, tiempo de absorción (min); B, tiempo de inmersión (min) y C, tiempo de desorción (min).

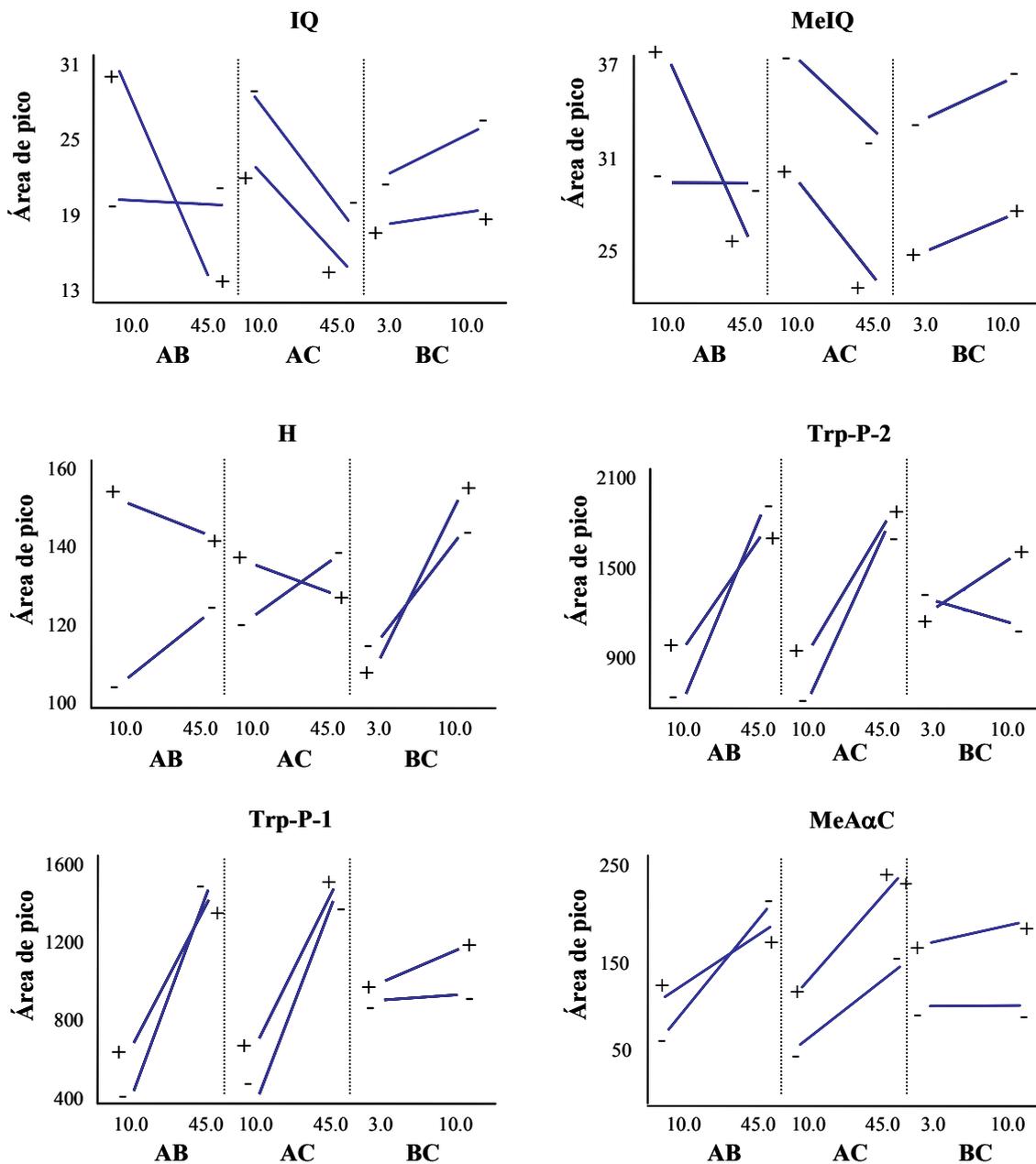


Figura II.2.7. Interacciones de los efectos principales para algunas aminas representativas, donde: A, tiempo de absorción (min); B, tiempo de inmersión (min) y C, tiempo de desorción (min).

Con objeto de optimizar aquellas variables que tienen una influencia significativa, el tiempo de absorción y el tiempo de inmersión, se ha llevado a cabo un diseño Doehlert. Para dos variables, este diseño Doehlert consiste en un punto central y seis puntos formando un hexágono regular [30, 31]. Para obtener más información sobre el sistema, se escogieron cinco niveles para el tiempo de absorción, ya que es la variable con mayor efecto, y tres niveles para el tiempo de inmersión. El punto central obtenido fue de 25 min para el tiempo de absorción y 9 min para el tiempo de inmersión. El tiempo de desorción se fijó en 1 min, atendiendo al efecto negativo que este factor causa en la respuesta de las aminas polares, unido a la baja sensibilidad que presentan estas aminas.

Las siete experiencias requeridas por la matriz Doehlert y los resultados experimentales obtenidos para las aminas estudiadas se agrupan en la Tabla II.2.4. Esta matriz permite la estimación de los coeficientes (b) del modelo polinomial de segundo grado que define la superficie de respuesta (SR), como se indica en la siguiente ecuación:

$$SR = b_0 + b_1[t_{abs}] + b_2[t_{inm}] + b_{11}[t_{abs}]^2 + b_{22}[t_{inm}]^2 + b_{12}[t_{abs}] [t_{inm}]$$

Los valores de los coeficientes para cada amina se muestran en la Tabla II.2.5. Los valores negativos de los coeficientes de las variables individuales obtenidos para las aminas polares frente a los valores positivos, obtenidos para el resto de las aminas, muestran el efecto negativo que estos factores tienen sobre las recuperaciones de dichas aminas. Probablemente, la causa de este efecto se encuentre en una fuerte interacción entre los analitos y el recubrimiento de la fibra.

Tabla II.2.4. Matriz del diseño Doehlert. Resultados experimentales (1) y calculados (2) para las AHs.

Experiencia	t_{abs}	t_{min}	Respuesta (Área de pico) para las AHs polares					
			IQ		MeIQ		MeIQx	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
1	45	9	27.8	26.6	41.4	36.7	11.4	11.8
2	35	15	31.8	33.0	34.0	38.7	10.4	10.0
3	35	3	30.9	32.1	42.9	47.6	9.0	8.6
4	25	9	33.3	33.3	44.9	44.9	10.9	10.9
5	5	9	57.3	58.5	49.4	54.1	25.7	25.3
6	15	15	50.5	49.3	57.3	52.6	15.3	15.7
7	15	3	49.1	47.9	55.6	50.9	15.8	16.2

Experiencia	t_{abs}	t_{min}	Respuesta (Área de pico) para las AHs menos polares											
			NH		H		Trp-P-2		Trp-P-1		A α C		MeA α C	
			(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
1	45	9	202	186	203	192	2308	2352	1607	1652	311	292	223	216
2	35	15	183	198	176	187	2017	1972	1415	1370	243	262	183	190
3	35	3	179	194	165	176	2110	2065	1473	1428	198	217	143	150
4	25	9	216	216	202	202	1972	1972	1345	1345	245	245	175	175
5	5	9	161	176	133	144	604	559	384	339	134	153	78.3	85.5
6	15	15	193	177	161	150	1144	1188	771	816	216	197	139	132
7	15	3	221	205	178	167	1012	1056	624	669	163	144	85.6	78.4

Tabla II.2.5. Valores de los coeficientes del modelo polinomial, coeficientes de regresión múltiple (R) y valores óptimos de los tiempos de absorción e inmersión para cada una de las aminas estudiadas de acuerdo con el modelo descrito.

	IQ	MeIQ	MeIQx	NH	H	Trp-P-2	Trp-P-1	AαC	MeAαC
Coefficientes									
b₀	77.57	54.73	32.27	164.8	94.92	-793.0	-667.8	1.583	-62.39
b₁	-1.937	-0.098	-1.364	3.362	4.383	117.8	84.20	6.579	6.803
b₂	-2.333	-0.408	-0.066	2.354	8.583	161.2	118.5	22.10	20.92
b₁₁	0.023	0.001	0.019	-0.086	-0.085	-1.290	-0.874	-0.056	-0.061
b₂₂	0.138	0.067	-0.005	-0.371	-0.653	-7.562	-5.191	-0.955	-0.868
b₁₂	-0.002	-0.044	0.008	0.133	0.117	-0.938	-0.854	-0.033	-0.056
R	0.994	0.823	0.997	0.684	0.885	0.997	0.995	0.944	0.990
(t_{abs})^{Óptimo}	5	5	5	25	32	42	44	45	45
(t_{imm})^{Óptimo}	15	15	3	7.8	9.4	8	7.8	10.8	10.6

Existe una buena concordancia entre los valores predichos por el modelo y los valores experimentales como puede verse en la Tabla II.2.4. En la Tabla II.2.5 se puede observar que los coeficientes de regresión múltiple calculados por el modelo se encuentran en el rango 0.823-0.997 (excepto NH), siendo mayores de 0.99 para la mayoría de las aminas estudiadas. Asimismo, en esta tabla se encuentran los valores de los tiempos de absorción y de inmersión óptimos para cada una de las aminas.

En la Figura II.2.8 se muestran las superficies de respuesta para algunas de las aminas. Las aminas menos polares muestran un máximo (valores óptimos) que cae dentro del dominio experimental. Por el contrario, las superficies de respuesta para las aminas polares no muestran un máximo en la región experimental cubierta por el diseño y las recuperaciones máximas se obtienen para bajos tiempos de absorción (5 min) y altos valores de tiempos de inmersión (15 min, excepto para MeIQx).

Atendiendo a los resultados comentados, y teniendo en cuenta que las aminas polares muestran una baja sensibilidad, se eligieron como condiciones óptimas, 15 min para el tiempo de absorción y 15 min para el tiempo de inmersión.

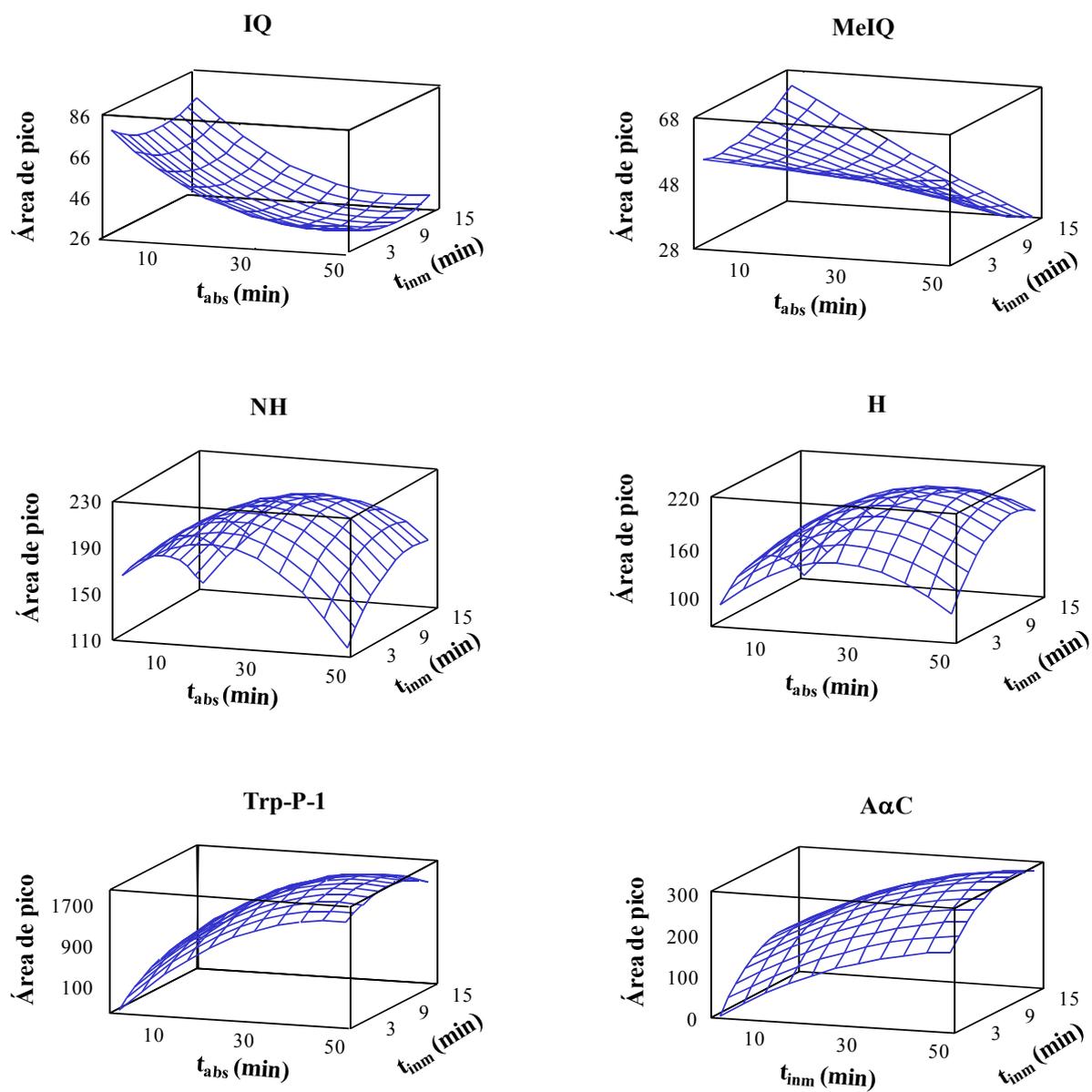


Figura II.2.8. Superficies de respuesta para algunas aminas representativas

II.2.4 Parámetros de calidad del método SPME-HPLC con detección Vis-UV optimizado

Utilizando las condiciones experimentales optimizadas, 15 min para el tiempo de absorción, 15 min para el tiempo de inmersión y 1 min para el tiempo de desorción, se evaluó el procedimiento analítico basado en el acoplamiento SPME-HPLC.

Al igual que para otros métodos analíticos, es necesario conocer los parámetros de calidad, entre los que destacan los siguientes: rango de linealidad, límite de detección y precisión de las determinaciones. La Tabla II.2.6 muestra los valores obtenidos, a partir de datos experimentales, para dichos parámetros.

Las curvas analíticas se establecieron a partir de disoluciones que contenían concentraciones de AHs en los rangos indicados en la Tabla II.2.6. En general, se observa una buena linealidad en los rangos de concentración empleados, con coeficientes de correlación que oscilan entre 0.982 y 0.999. El bajo coeficiente de correlación para MeA α C, puede atribuirse al mayor tiempo de absorción óptimo para esta amina.

Los límites de detección (LD) para el método SPME-HPLC se han calculado de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Cuadros *et al.* [32], según el cual:

$$LD(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}) = \left(\frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \right) \cdot \sqrt{\frac{n-2}{n-1}}$$

siendo $S_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado, b la pendiente de la recta de calibrado y n el número de patrones utilizados en el calibrado.

Los límites de detección obtenidos para cada una de las aminas analizadas oscilan entre 1.58 ng mL⁻¹ para Trp-P-2 y 23.8 ng mL⁻¹ para PhIP. En general, las aminas menos polares presentan límites de detección más bajos que las aminas polares, con la excepción de MeIQx, a la que corresponde la menor sensibilidad de calibración.

La precisión del método se evaluó llevando a cabo la extracción de tres muestras en tres días consecutivos para las concentraciones de AHs indicadas en la Tabla II.2.6. Las desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidas oscilan entre 2.21 y 28.3%. En general, algunas de las AHs que presentan una menor sensibilidad, también les corresponden las menores precisiones.

Tabla II.2.6. Parámetros de calidad del procedimiento analítico optimizado (SPME-HPLC con detección Vis-UV).

Compuesto	Rango de linealidad (ng mL ⁻¹)	Pendiente ± SD	Ordenada Origen ± SD	R	S _{y/x}	LD (ng mL ⁻¹)	RSD ^a (%)
IQ	40-153.6	0.101 ± 0.004	0.9 ± 0.4	0.996	0.348	9.81	16.6 (80.0)
MeIQ	40-153.6	0.211 ± 0.008	1.4 ± 0.7	0.997	0.842	11.3	5.78 (80.0)
MeIQx	40-153.6	0.069 ± 0.005	0.2 ± 0.6	0.990	0.411	16.8	28.3 (80.0)
NH	21.8-83.9	0.518 ± 0.023	0.93 ± 1.20	0.994	1.36	7.47	6.34 (43.7)
H	19-72.9	0.77 ± 0.02	1 ± 1	0.997	1.36	5.07	6.38 (38.0)
Trp-P-2	10-38.4	5.8 ± 0.1	0.85 ± 3.42	0.999	3.23	1.58	2.21 (20.0)
PhIP	40-153.6	0.094 ± 0.008	2.1 ± 0.8	0.987	0.80	23.8	9.65 (80.0)
Trp-P-1	10.1-38.9	4.9 ± 0.2	0.97 ± 7.31	0.992	5.91	3.43	5.84 (20.2)
AαC	20-76.8	1.18 ± 0.03	0.17 ± 1.2	0.998	1.33	3.24	8.65 (40.0)
MeAαC	20-76.8	0.91 ± 0.07	0.09 ± 3.69	0.982	4.17	13.1	8.21 (40.0)

^aPrecisión Intermedia: Se analizaron 3 muestras en 3 días consecutivos. Los valores entre paréntesis indican la concentración (ng mL⁻¹) utilizada

II.2.5 Determinación de AHs en extractos de carne comerciales mediante SPME-HPLC con detección Vis-UV

Con objeto de establecer la aplicabilidad del método SPME-HPLC con detección Vis-UV desarrollado al análisis de AHs en muestras de alimentos, se llevó a cabo la determinación de las mismas en muestras de extractos de carne comerciales.

Para llevar a cabo el análisis, a 1 g de extracto de carne comercial se le añadieron concentraciones conocidas de las AHs, tal y como se indica en el apartado IV.4.1 de la Parte Experimental. Posteriormente la muestra se disolvió en 2 mL de NaOH metanólica (NaOH 0.1 M : metanol, 7:3, v/v) y se realizó la extracción durante 15 minutos con la ayuda de ultrasonidos, seguida de centrifugación durante 20 minutos (4000 rpm). Una alícuota del sobrenadante (0.3 mL) se diluyó a 10 mL con agua MilliQ y se analizó de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito.

La Tabla II.2.7 resume las recuperaciones obtenidas y las desviaciones estándar halladas para análisis repetidos de los extractos de carne enriquecidos, después de restar los valores correspondientes a una muestra de extracto no enriquecida. Las recuperaciones se encuentran entre 41.7% para Trp-P-1 y 115.4% para MeIQx. Seis aminas muestran recuperaciones mayores del 70%, mientras que las recuperaciones más bajas se obtienen para Trp-P-1 y Trp-P-2, resultados que son concordantes con los obtenidos por otros autores [33]. La Figura II.2.9 muestra el cromatograma de un extracto de carne tratado como se ha dicho anteriormente.

Finalmente, el método fue aplicado a la determinación de AHs en muestras de extractos de carne sin enriquecer. Solamente H y NH fueron detectados, aunque no cuantificados, y el resto de las aminas se encuentra a niveles menores que los establecidos para los respectivos límites de detección. Los resultados están en concordancia con los referidos por otros autores [34].

Tabla II.2.7. Recuperaciones de AHs en extracto de carne comercial enriquecido.

Compuesto	Concentración (ng mL ⁻¹)	Recuperación ^a ± SD
IQ	57.0	77.3 ± 24.8
MeIQ	60.0	80.2 ± 2.4
MeIQx	57.0	115.4 ± 16.5
NH	29.2	81.7 ± 0.99
H	25.9	111.7 ± 26.8
Trp-P-2	22.5	51.7 ± 3.2
PhIP	52.5	57.2 ± 17.6
Trp-P-1	24.6	41.7 ± 3.6
AαC	22.5	64.1 ± 3.7
MeAαC	21.4	70.9 ± 3.3

^a Valores medios de 3 extracciones independientes.

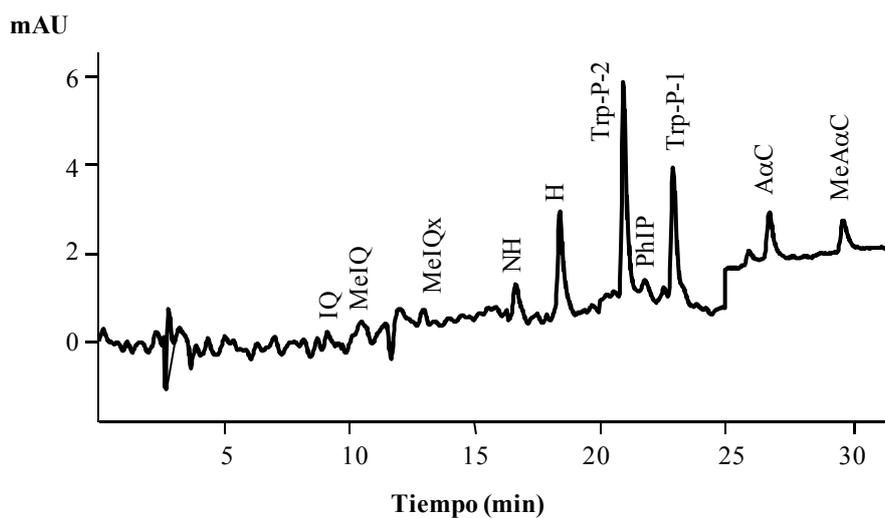


Figura II.2.9. Cromatograma de un extracto de carne enriquecido.

II.3 Determinación de Aminas Heterocíclicas utilizando microextracción en fase sólida acoplada a HPLC con detección fluorescente

II.3.1 Método SPME-HPLC con detección fluorescente

En el apartado anterior se ha puesto de manifiesto que el método desarrollado para la determinación de AHs permite la cuantificación de todas las aminas seleccionadas a niveles de concentración que, en algunos casos, deben sobrepasar las 10-20 ng mL⁻¹. En atención a las bajas concentraciones en que suelen encontrarse las AHs en los alimentos, nos hemos propuesto desarrollar una nueva metodología, que proporcione mayor sensibilidad, basada en la sustitución del detector Vis-UV de diodos en fila por otro de fluorescencia. Ahora bien, puesto que las aminas polares: IQ, MeIQ y MeIQx no presentan fluorescencia en las condiciones experimentales utilizadas, los analitos a estudiar se reducen a: H, NH, Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, AαC y MeAαC.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el proceso de optimización del método SPME-HPLC llevado a cabo anteriormente (Tabla II.2.5), y a las aminas incluidas en este estudio, se han elegido las siguientes condiciones experimentales: $t_{\text{abs}} = 30$ min, $t_{\text{imm}} = 9$ min y $t_{\text{des}} = 1$ min. En la Figura II.3.1 se comparan los resultados obtenidos en las condiciones elegidas y en las utilizadas en el estudio anterior, con tiempos de absorción e inmersión de 15 min. Como puede observarse, los resultados mejoran ligeramente, con la excepción de la PhIP, lo que en principio era de esperar, dado el carácter polar de esta amina.

Por otra parte, atendiendo a la naturaleza no polar de la mayoría de las aminas incluidas en este estudio, se consideró de interés escoger como disolvente de desorción, el metanol. En la Figura II.3.2 se compara la eficiencia de desorción, expresada como área de pico, utilizando como disolvente metanol o la fase móvil inicial empleada en HPLC. Con la excepción de PhIP que, por su naturaleza polar, muestra una mayor afinidad por la fase polimérica de la fibra, en general, se observa que, la utilización de metanol como disolvente, conduce a importantes aumentos en la eficiencia de desorción, llegando a alcanzar, para algunas de las aminas, incrementos superiores al 100%.

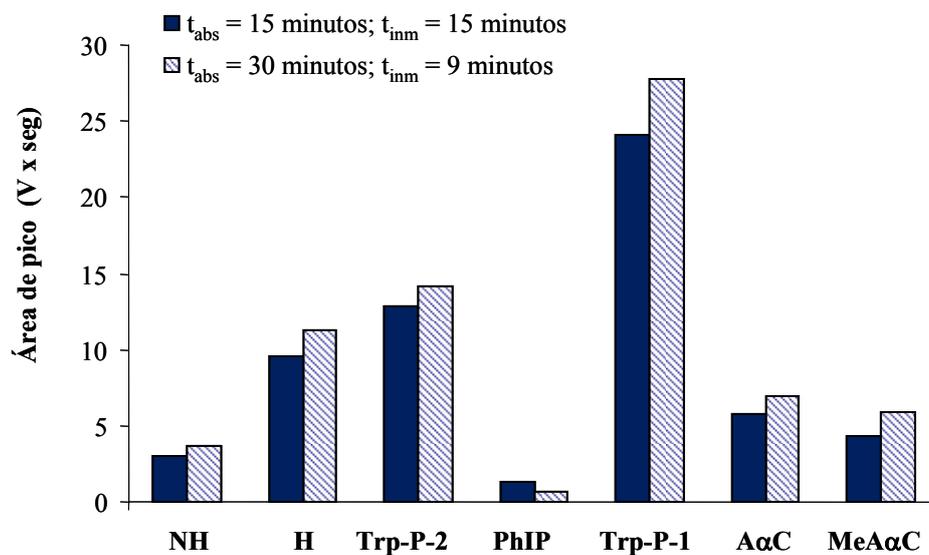


Figura II.3.1. Influencia del tiempo de absorción (t_{abs}) y tiempo de inmersión (t_{inm}) en la eficiencia de la extracción expresada como área de pico cromatográfico, para un tiempo de desorción de 1 minuto.

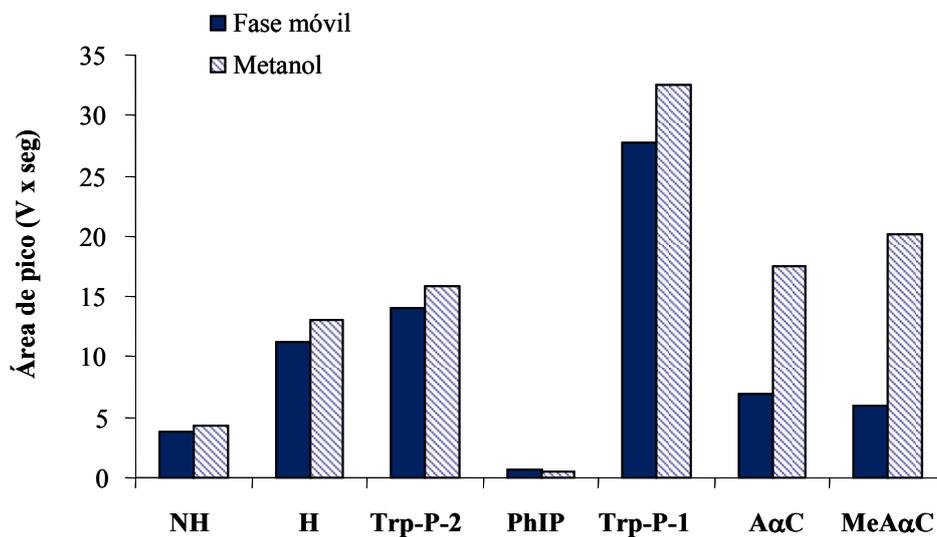


Figura II.3.2. Influencia del disolvente de desorción en la eficiencia de la extracción.

Para estudiar el efecto memoria de las AHs utilizando como disolvente de desorción el metanol, se llevaron a cabo estudios que consistían en lavar con porciones de 250 μL de una mezcla de fase móvil (TEA/fosfórico a pH 3.6:acetonitrilo, 50:50), que favorezca la desorción de las AHs menos polares. Cada lavado se sigue de una desorción en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados muestran que, después de cuatro lavados, NH no mostraba efecto memoria y el resto de las aminos mostraban retenciones inferiores al 0.5%. En la Figura II.3.3 se muestra la variación del porcentaje de retención de cada una de las aminos con el número de lavados realizados.

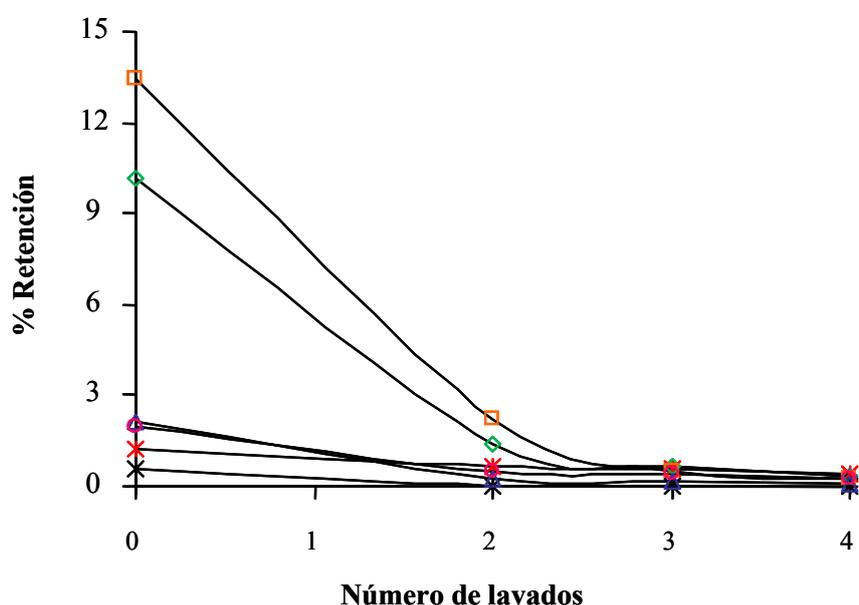


Figura II.3.3. Efecto memoria utilizando metanol como disolvente de desorción. NH (×), H (*), Trp-P-2 (◇), Trp-P-1 (□), AαC (△) y MeAαC (○).

Dado que la SPME es un proceso de equilibrio, el efecto memoria es inferior a otras técnicas, aunque debe minimizarse. De acuerdo con los resultados obtenidos, se recomienda que la fibra y la cámara de desorción sean lavadas 4 veces con porciones de 250 μL de la mezcla de fase móvil, para minimizar los efectos de retención, tanto en la fibra como en la interfaz.

Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión

Con objeto de obtener la máxima sensibilidad del detector de fluorescencia, se estudió el efecto de la composición de la fase móvil en el comportamiento fluorescente de cada una de las aminas a la correspondiente composición de la fase móvil, según el programa de gradiente descrito anteriormente. En la Figura II.3.4, se muestran espectros de excitación y emisión para algunas aminas representativas. A partir de las longitudes de onda de excitación y emisión máximas obtenidas para cada compuesto, incluidos en la Tabla II.3.1, se ha podido elegir el programa de longitudes de onda que se encuentra en la Tabla IV.3.3 de la Parte Experimental.

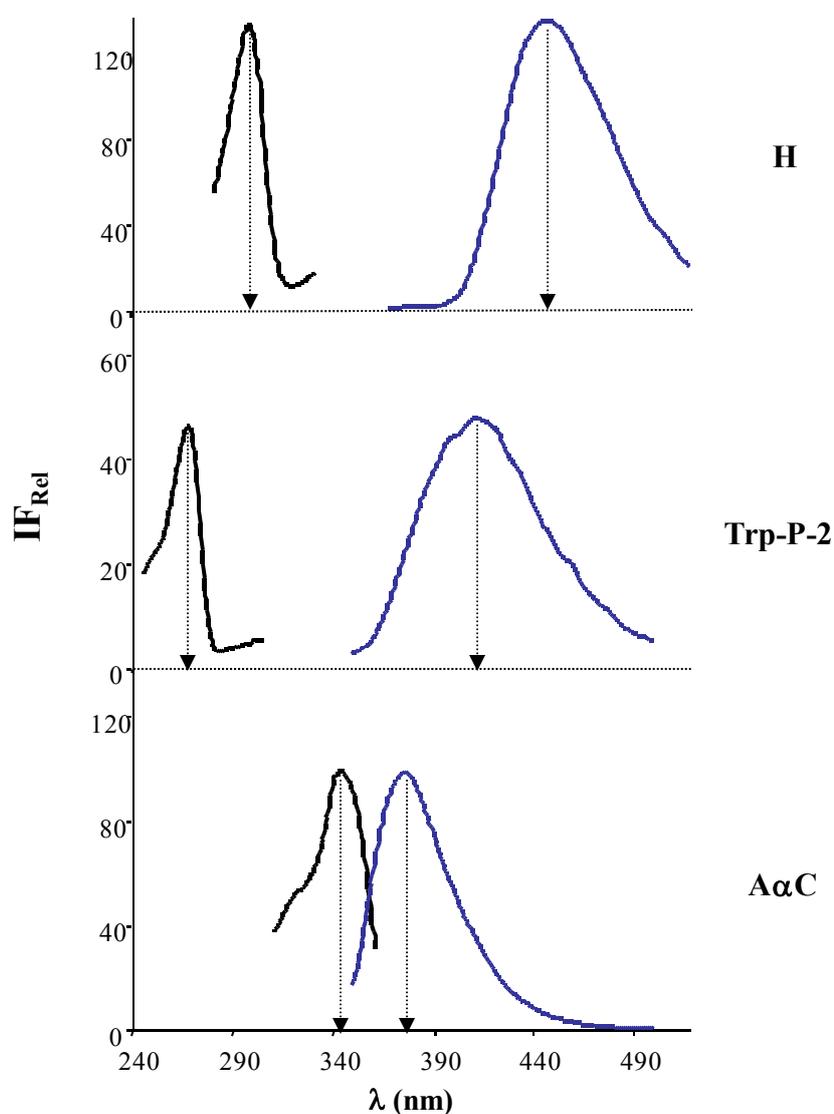


Figura II.3.4. Espectros de excitación y emisión de tres aminas representativas.

Tabla II.3.1. Longitudes de onda de excitación y emisión máximas para las aminas estudiadas.

Compuesto	$\lambda_{\text{excitación}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{emisión}} \text{ (nm)}$
NH	300	448
H	296	436
Trp-P-2	268	414
PhIP	340	408
Trp-P-1	260	410
A α C	342	383
MeA α C	344	389

II.3.2 Parámetros de calidad del método SPME-HPLC con detección fluorescente

Para llevar a cabo la validación del método propuesto, se verificaron los siguientes parámetros de calidad: rango de linealidad, límite de detección y precisión de las determinaciones. La Tabla II.3.2 muestra los parámetros estadísticos obtenidos a partir de las rectas de calibrado y el límite de detección para cada una de las aminas estudiadas.

Las curvas analíticas se establecieron a partir de disoluciones que contenían cantidades de AHs en los rangos indicados en la Tabla II.3.2. En general, se observa una buena linealidad entre las áreas de los respectivos picos cromatográficos y las concentraciones de los analitos, con coeficientes de correlación que oscilan entre 0.986 y 0.998. Los límites de detección (LD) para el método SPME-HPLC con detección fluorescente oscilan entre 0.047 ng mL⁻¹ para MeA α C y 0.190 ng mL⁻¹ para PhIP, calculados de acuerdo con la siguiente expresión:

$$LD(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}) = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Tabla II.3.2. Parámetros de calidad del método analítico propuesto (SPME-HPLC con detección fluorescente).

Compuesto	Rango linealidad (ng mL ⁻¹)	Pendiente ± SD	Ordenada Origen ± SD	R	S _{y/x}	LD (ng mL ⁻¹)	RSD ^a (%)
NH	0.390-3.90	0.45 ± 0.01	-0.02 ± 0.03	0.997	0.045	0.099	8.9 (2.34)
H	0.345-3.45	1.40 ± 0.03	-0.14 ± 0.05	0.998	0.089	0.064	8.0 (2.07)
Trp-P-2	0.300-3.00	4.7 ± 0.1	-1.09 ± 0.23	0.996	0.401	0.085	8.1 (1.80)
PhIP	0.700-7.00	0.085 ± 0.003	0.02 ± 0.01	0.997	0.016	0.189	6.6 (4.20)
Trp-P-1	0.328-3.28	1.6 ± 0.1	-0.6 ± 0.2	0.986	0.307	0.186	6.1 (1.97)
AαC	0.300-3.00	4.7 ± 0.1	-0.4 ± 0.2	0.997	0.340	0.072	5.8 (1.80)
MeAαC	0.285-2.85	6.1 ± 0.1	-0.7 ± 0.2	0.998	0.284	0.047	5.7 (1.71)

^a Precisión Intermedia: Se analizaron 3 muestras en 3 días consecutivos. Los valores entre paréntesis indican la concentración (ng mL⁻¹) utilizada.

Debe destacarse que los límites de detección obtenidos son entre 40 y 100 veces menores que los obtenidos con el método SPME-HPLC con detección Vis-UV desarrollado en el apartado II.2 de este Capítulo.

Con objeto de determinar la precisión intermedia asociada a la determinación de cada una de las aminos, tres muestras, con las concentraciones indicadas en la Tabla II.3.2, fueron analizadas durante tres días consecutivos. El análisis de la varianza llevado a cabo, indica que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en diferentes días para todas las aminos estudiadas, con un nivel de significación de 0.05.

II.3.3 Determinación de AHs en extractos de carne comerciales mediante una extracción asistida por ultrasonidos seguida de SPME-HPLC con detección fluorescente

La aplicación de la microextracción en fase sólida a la determinación de aminos heterocíclicas presentes en muestras sólidas, y, entre ellas, a extractos de carne, requiere de un proceso de solubilización previo, preferentemente en un medio acuoso o acuo-orgánico.

Los estudios encaminados a establecer las condiciones apropiadas para la solubilización de las AHs contenidas en extractos de carne, se han llevado a cabo utilizando una muestra de granulado de caldo de carne. Una vez que el extracto ha sido enriquecido con cantidades conocidas de AHs, como se describe en el apartado IV.4.1 de la Parte Experimental, se le añade un cierto volumen de fase extractante, constituida por NaOH-metanol, cuyas concentraciones dependen del experimento que se esté llevando a cabo. La extracción se realiza en un vaso reactor introducido en un baño de ultrasonidos de potencia fija y a una temperatura de 45°C, durante un tiempo prefijado, que viene dado por el diseño experimental utilizado, como se comentará posteriormente.

Atendiendo a los estudios previos realizados, existen varios factores que pueden afectar potencialmente a la extracción: porcentaje de metanol y concentración de NaOH en la fase extractante, y el tiempo de extracción. Otras variables como la cantidad de muestra (1 gramo), cantidad de AHs empleada para enriquecer las muestras y el

volumen de fase extractante (3 mL) se mantuvieron constantes en los diferentes experimentos.

Como primera aproximación a la superficie de respuesta del método de extracción de AHs, se utilizó un diseño factorial completo de dos niveles 2^3 con dos puntos centrales, implicando 10 experimentos. Las variables estudiadas, así como sus valores se muestran en la Tabla II.3.3. Los niveles máximos (+) y mínimos (-) se escogieron de acuerdo con experiencias previas.

Tabla II.3.3. Niveles de los factores en el diseño previo

Factor	Clave	Menor (-)	Mayor (+)
% Metanol	A	2.5	25
Concentración de NaOH (M)	B	0.05	1.0
Tiempo de extracción, t_{ext} (min)	C	5.0	20

Los parámetros del diseño experimental, así como las respuestas elementales obtenidas se muestran en la Tabla II.3.4. La respuesta considerada fue la recuperación obtenida para cada una de las aminas estudiadas. El listado de las experiencias del diseño experimental representa el orden aleatorio estadístico con que los experimentos se llevaron a cabo.

Tabla II.3.4. Matriz del diseño factorial y valores de la respuesta, expresados como área de pico.

Experiencia	% MeOH	[NaOH] (M)	t _{ext} (min)	Área de pico (V x seg)						
				NH	H	Trp-P-2	PhIP	Trp-P-1	AαC	MeAαC
1	2.5	0.05	20	0.971	2.56	6.28	0.346	3.67	2.39	1.82
2	13.75	0.525	12.5	0.860	2.58	5.91	0.404	3.38	2.50	1.95
3	25	0.05	20	0.965	2.68	6.72	0.340	3.53	2.50	1.84
4	25	1.0	5.0	0.924	2.48	4.05	0.366	2.81	2.15	1.47
5	2.5	1.0	5.0	0.886	2.31	4.72	0.596	2.62	1.89	1.26
6	2.5	0.05	5.0	1.04	2.63	7.36	0.508	4.47	2.78	1.86
7	25	1.0	20	0.945	3.27	5.30	0.412	3.31	1.97	1.57
8	2.5	1.0	20	0.903	2.39	5.31	0.453	2.92	2.09	1.37
9	13.75	0.525	12.5	0.899	2.60	6.02	0.515	3.69	2.15	1.51
10	25	0.05	5.0	1.16	3.02	8.23	0.476	5.36	2.67	2.20

Los efectos de los factores principales en la respuesta se muestran en la Figura II.3.5, donde podemos observar que para la mayoría de las aminas, el porcentaje de metanol en la fase extractante tiene un efecto positivo, mientras que la concentración de NaOH y el tiempo de extracción presentan, en la mayoría de los casos, un efecto negativo.

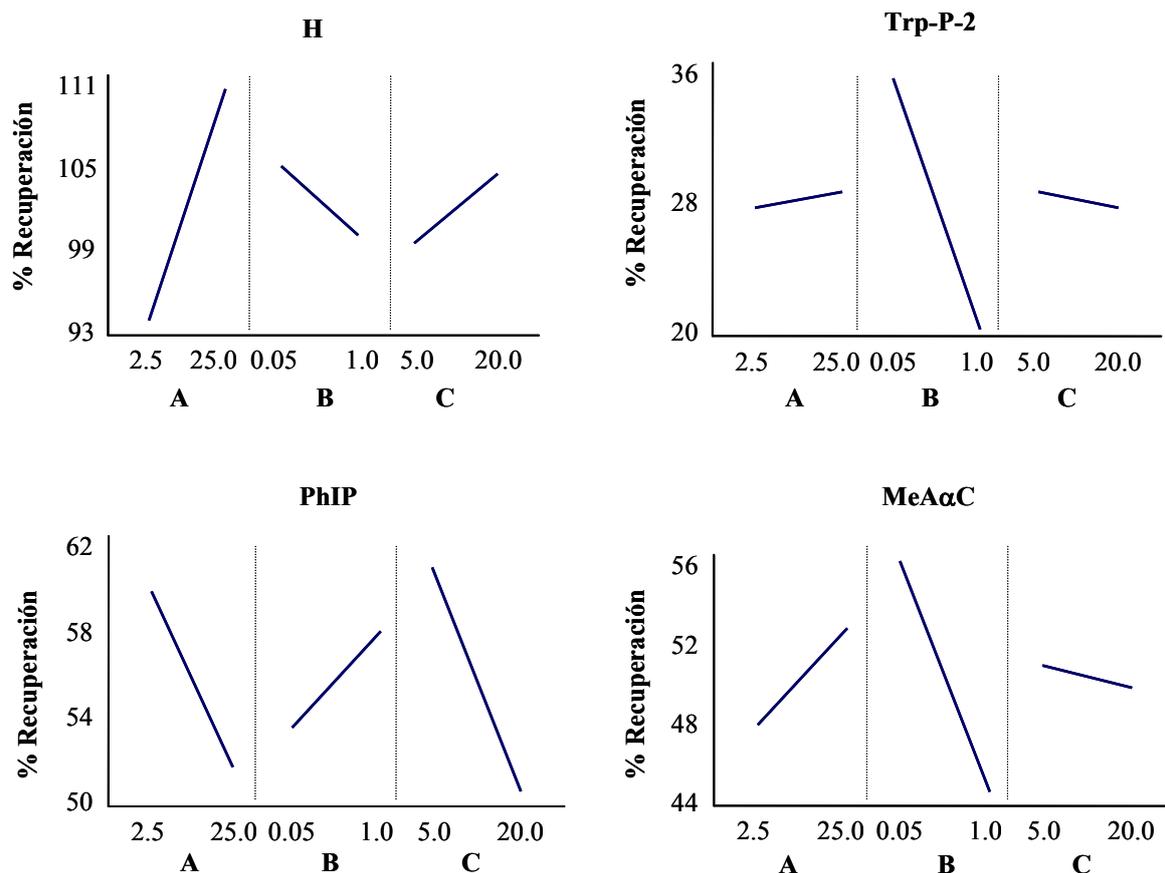


Figura II.3.5. Efectos de los factores principales para algunas aminas representativas, donde: A, porcentaje de metanol; B, concentración de NaOH (M); C, tiempo de extracción (min)

La Figura II.3.6 muestra la interacción entre los factores para algunas aminas representativas. Para todas las aminas estudiadas, excepto PhIP, existe una interacción entre la concentración de NaOH y el tiempo de extracción.

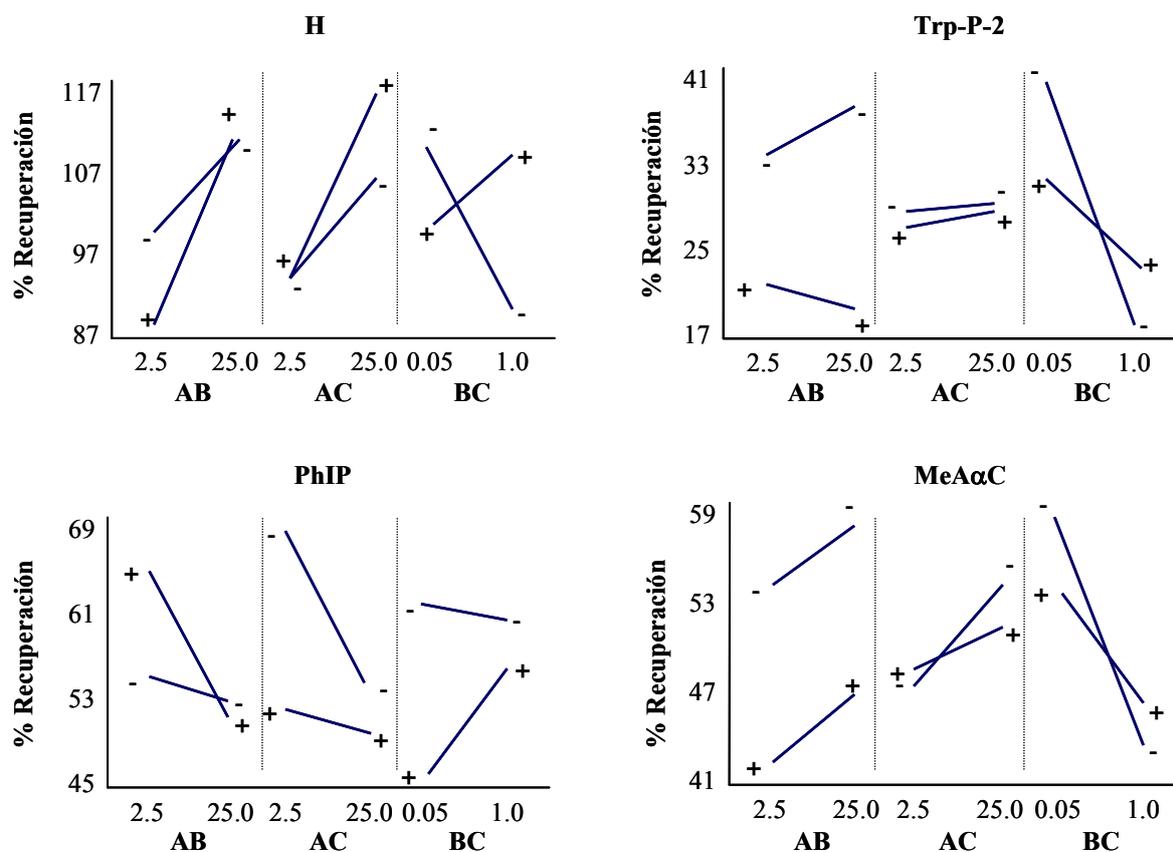


Figura II.3.6. Interacciones entre los efectos principales para algunas aminas representativas, donde: A, porcentaje de metanol; B, concentración de NaOH (M); C, tiempo de extracción (min).

Se utilizó el análisis de varianza para estimar la significación de los efectos principales y sus interacciones. El análisis de los resultados muestra que, con la excepción de H y PhIP, el factor B (concentración de NaOH) es estadísticamente el más significativo. La interacción B (concentración de NaOH) x C (tiempo de extracción) es también estadísticamente significativa, mientras que el resto de factores y sus interacciones no lo son. Las Cartas de Pareto de efectos mostradas en la Figura II.3.7, para algunas de las aminas, ponen de manifiesto los comentarios que se acaban de realizar.

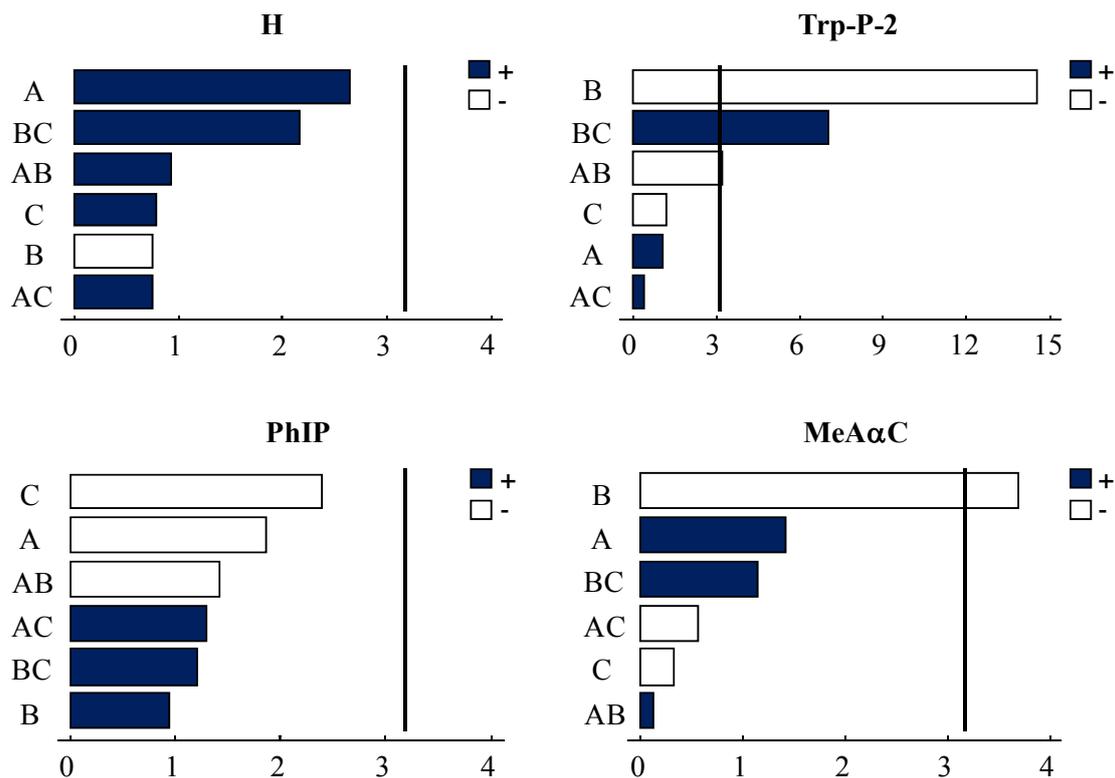


Figura II.3.7. Cartas de Pareto de efectos estandarizados de algunas aminas representativas.

Con objeto de mejorar la optimización de las variables, se aplicó un diseño central, 2^2 + estrella, con dos puntos centrales, teniendo como factores aquellos que resultaron estadísticamente significativos y para los que existiera fuerte interacción entre ellos, la concentración de NaOH en la fase extractante y el tiempo de extracción. Este diseño factorial implica un total de 10 experiencias aleatorias, la distancia axial se fijó en un valor de 1.078 para establecer la condición de ortogonalidad.

El porcentaje de metanol en la fase extractante se mantuvo constante e igual a 2.5%. Aunque su efecto es positivo, como se ha comentado anteriormente, elevados porcentajes de metanol en el extracto obtenido tienen un efecto adverso en la posterior microextracción en fase sólida. Los factores se estudiaron a los niveles que se muestran en la Tabla II.3.5.

Tabla II.3.5. Niveles de los factores en el diseño central

Factor	Fijado	Menor (-)	Mayor (+)
% Metanol	2.5	-	-
Concentración de NaOH (M)	-	0.01	0.05
Tiempo de extracción, t_{ext} (min)	-	2.0	7.0

La matriz de diseño establecida a partir de los datos anteriores, así como las respuestas obtenidas, se han agrupado en la Tabla II.3.6.

Tabla II.3.6. Matriz de diseño experimental y valores de las respuestas, expresadas como áreas de pico.

Experiencia	[NaOH] (M)	t_{ext} (min)	Respuesta (Área de pico)						
			NH	H	Trp-P-2	PhIP	Trp-P-1	A α C	MeA α C
1	0.01	7.0	0.413	0.474	3.08	2.10	2.10	6.28	5.54
2	0.05	7.0	1.25	2.99	6.70	2.07	3.74	5.77	5.12
3	0.052	4.5	1.12	3.02	9.48	2.11	5.43	5.92	5.72
4	0.05	2.0	1.23	1.96	6.29	1.74	3.37	5.19	4.20
5	0.030	1.804	1.14	1.78	6.70	1.95	3.39	4.81	4.29
6	0.008	4.5	0.472	0.778	3.45	2.39	2.18	6.81	6.16
7	0.030	4.5	1.00	1.56	4.73	2.32	2.49	5.97	5.21
8	0.030	4.5	0.977	1.38	5.13	2.20	2.83	5.45	5.06
9	0.030	7.195	1.08	1.89	5.99	2.39	3.47	5.34	4.98
10	0.01	2.0	0.600	0.836	4.08	2.51	2.80	7.28	6.77

Esta matriz permite la estimación de los coeficientes (b) del modelo polinomial de segundo grado, que define la superficie de respuesta (SR) como se indica en la siguiente ecuación:

$$SR = b_0 + b_1[\text{NaOH}] + b_2[t_{\text{ext}}] + b_{11}[\text{NaOH}]^2 + b_{22}[t_{\text{ext}}]^2 + b_{12}[\text{NaOH}][t_{\text{ext}}]$$

Los valores de los coeficientes para cada amina se muestran en la Tabla II.3.7. En general, las superficies de respuesta no muestran un máximo en la región experimental cubierta por el diseño. Los coeficientes de regresión múltiple calculados para el modelo se encuentran en el rango 0.767-0.989, con la excepción de la Trp-P-1 para la cual el modelo solamente explica el 67% de la variabilidad.

Tabla II.3.7. Valores de los coeficientes del modelo polinomial, coeficientes de regresión (R) y valores óptimos para cada una de las aminas estudiadas.

	NH	H	Trp-P-2	PhIP	Trp-P-1	AαC	MeAαC
Coefficientes							
b₀	0.498	1.016	3.690	2.451	2.944	8.161	7.473
b₁	42.0	9.166	65.86	-18.86	-20.23	-180.8	-180.2
b₂	-0.154	-0.153	-0.141	0.084	-0.109	0.244	0.318
b₁₁	-493.9	123.1	0.400	-110.3	686.3	1952	1740
b₂₂	0.012	-0.0007	-0.017	-0.019	-0.007	-0.052	-0.068
b₁₂	1.045	6.980	7.055	3.730	5.370	7.900	10.73
R	0.989	0.950	0.767	0.813	0.670	0.896	0.878
[NaOH]_{óptimo}	0.0501	0.0501	0.0515	0.0084	0.0516	0.0084	0.0084
(t_{ext})_{óptimo}	7.195	7.195	6.449	3.035	7.195	2.964	3.000

En la Figura II.3.8 se muestran las superficies de respuesta correspondientes a algunas aminas representativas.

Para las diferentes aminas estudiadas, los valores óptimos para el tiempo de extracción oscilan entre 2.9 y 7.2 min, mientras que los valores óptimos para la concentración de NaOH es 0.008 M para PhIP, AαC y MeAαC, y 0.05 M para el resto de las aminas. En general, altas concentraciones de NaOH en la fase extractante, trae consigo un mayor tiempo de extracción.

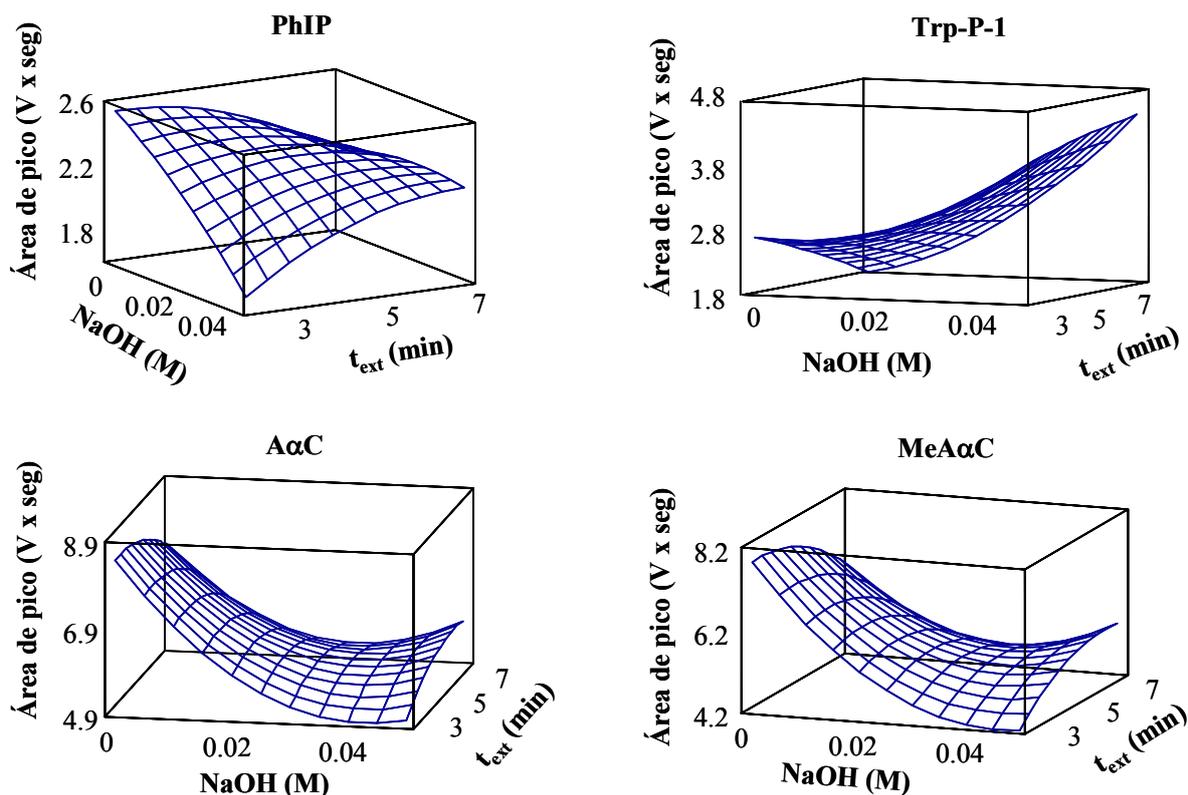


Figura II.3.8. Superficies de respuesta para alguna de las aminas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones experimentales óptimas de trabajo, con objeto de obtener la máxima recuperación posible de todas las aminas consideradas fueron: tiempo de extracción 4.5 min y concentración de NaOH en la fase extractante 0.05 M.

Influencia del porcentaje de metanol y número de extracciones

Con objeto de comprobar la influencia del porcentaje de metanol en la eficiencia de la extracción de las aminas en estudio y con las condiciones optimizadas anteriormente, se realizaron extracciones con cuatro porcentajes diferentes de metanol en la fase extractante: 2.5, 5, 10 y 15%.

Para estos porcentajes de metanol, los valores correspondientes a las recuperaciones de las distintas aminas se encuentran en la Figura II.3.9. Con la excepción de H y PhIP, las mejores recuperaciones se obtuvieron siempre para bajos porcentajes de metanol.

Con objeto de mejorar las recuperaciones obtenidas, se comprobó la influencia del número de extracciones, manteniendo las condiciones optimizadas previamente y un porcentaje de metanol en la fase extractante de 2.5%. Al realizar dos extracciones sucesivas se pone de manifiesto, en general, un aumento importante en las recuperaciones obtenidas. La Figura II.3.10 muestra que, con la excepción de la PhIP, las recuperaciones pueden mejora hasta un 30%, si se llevan a cabo dos extracciones sucesivas.

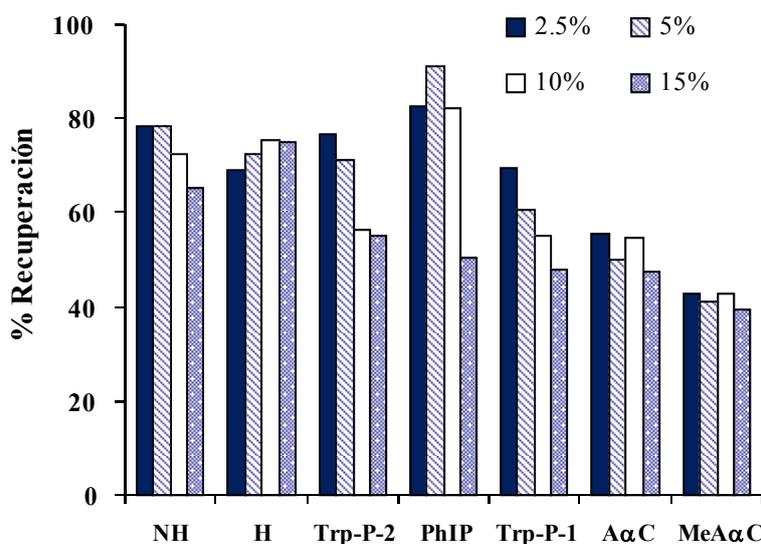


Figura II.3.9. Influencia del porcentaje de metanol en la eficiencia de la extracción.

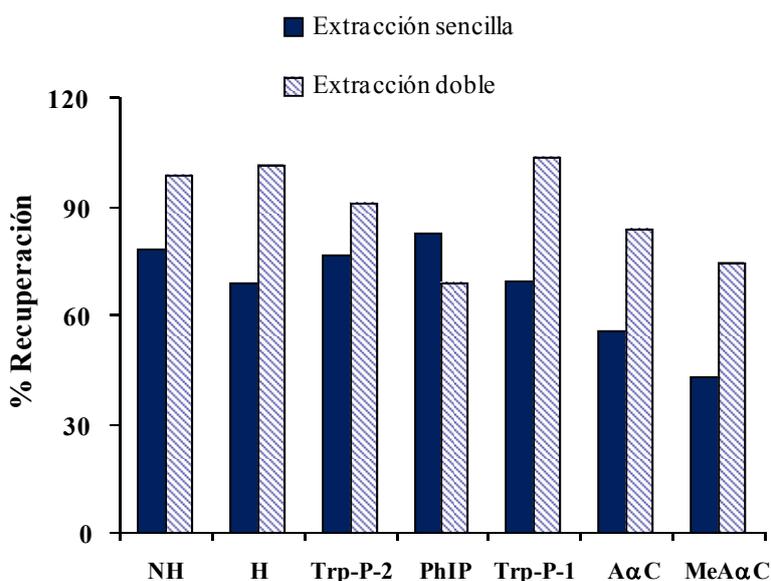


Figura II.3.10. Influencia del número de extracciones.

Estudios de recuperación y determinación de AHs en muestras reales

Atendiendo a los resultados obtenidos, se ha optado por utilizar, como condiciones experimentales óptimas de trabajo para la solubilización de las aminas, como paso previo a la SPME, las siguientes:

- Fase extractante: 0.05 M NaOH y 2.5% metanol.
- Volumen de fase extractante: 6 mL (doble extracción).
- Tiempo de extracción: 4.30 min.
- El extracto final se diluye tomando una alícuota de 250 μ L y llevándolo a 10 mL con agua MilliQ.

Con la finalidad de mejorar los límites de detección del método propuesto, se llevó a cabo la microextracción en fase sólida por inmersión directa de la fibra en el extracto obtenido haciendo uso de las condiciones óptimas indicadas anteriormente. Sin embargo, la turbidez de los extractos y el elevado contenido en grasa de las muestras utilizadas condujeron a bajas recuperaciones, probablemente por envenenamiento del propio recubrimiento de la fibra. En ese sentido, con objeto de disminuir el contenido en grasa del extracto, éste se congeló entre -18 y -20°C durante una hora [35-38] y en el extracto obtenido por decantación se lleva a cabo directamente la microextracción en fase sólida.

La Figura II.3.11 muestra un cromatograma representativo el cual, además de poner de manifiesto la escasa interferencia de la matriz de la muestra en los picos de interés analítico, permite la determinación de las aminas presentes en los extractos a niveles cuarenta veces inferiores a los obtenidos en la determinación SPME-HPLC con detección Vis-UV.

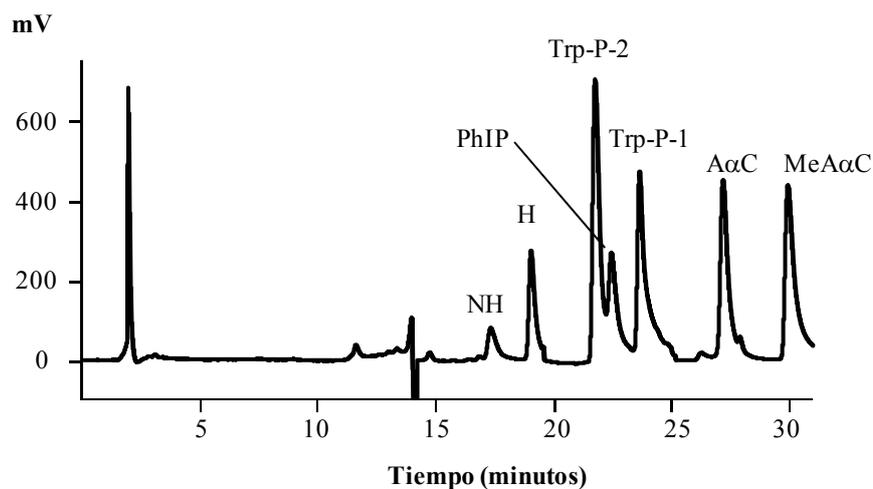


Figura II.3.11. Cromatograma de una muestra enriquecida y extraída por inmersión directa de la fibra en el extracto.

Con objeto de evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se llevaron a cabo estudios de recuperación en dos tipos diferentes de extractos de carne (granulado de caldo de carne y pastillas de caldo). En la Tabla II.3.8 se resumen las recuperaciones obtenidas para las dos muestras, enriquecidas a dos niveles de concentración incluidos dentro del intervalo de linealidad de las curvas analíticas del método.

Las recuperaciones obtenidas dependen de la naturaleza de la muestra y del nivel de concentración al que han sido enriquecidas. En general, las mejores recuperaciones se obtienen para altas concentraciones de aminos, con valores comprendidos entre 33.3 y 132.8%, y desviaciones estándar que oscilan entre 4.0 y 19.9%, siendo máximas en el caso del granulado de caldo de carne.

Por otra parte, las menores recuperaciones, obtenidas con muestras a las que se les añadieron menores niveles de AHs, llevan asociadas incertidumbres superiores, siendo máximas para aquellas aminos que se encuentran en el extracto, antes de su enriquecimiento, a niveles altos.

Tabla II.3.8. Recuperaciones en muestras enriquecidas a dos niveles de concentración.

Compuesto	Concentración añadida (ng g ⁻¹)		Recuperación ± SD ^a (%)		Concentración añadida (ng g ⁻¹)		Recuperación ± SD ^a (%)	
	Granulado de caldo de Carne	Pastillas de caldo (A)	Granulado de caldo de Carne	Pastillas de caldo (A)	Granulado de caldo de Carne	Pastillas de caldo (A)	Granulado de caldo de Carne	Pastillas de caldo (A)
NH	7.80		116.5 ± 19.9	56.2 ± 7.1	24.6		107.8 ± 14.4	71.8 ± 7.6
H	6.90		68.2 ± 5.8	63.5 ± 7.5	22.8		61.4 ± 6.6	67.4 ± 5.6
Trp-P-2	6.00		62.0 ± 6.9	49.4 ± 7.6	16.1		109.4 ± 8.7	98.5 ± 7.9
PhIP	14.0		105.8 ± 15.5	76.5 ± 14.8	159		109.6 ± 19.9	75.5 ± 10.9
Trp-P-1	6.50		77.2 ± 14.9	59.2 ± 16.5	15.7		130.5 ± 18.6	132.8 ± 14.8
AαC	6.00		53.8 ± 10.4	41.1 ± 6.4	18.9		66.8 ± 5.6	60.4 ± 6.0
MeAαC	5.70		28.7 ± 2.8	21.5 ± 4.7	19.2		51.6 ± 4.0	33.3 ± 4.5

^aLos intervalos de confianza están expresados como desviaciones estándar (SD) (n=3)

Por último, se han determinado directamente las aminas seleccionadas en muestras sin enriquecer. Las concentraciones halladas en las cuatro muestras estudiadas se han agrupado en la Tabla II.3.9.

Tabla II.3.9. Concentración de las AHs en muestras de extractos de carne comerciales.

Compuesto	Concentraciones (ng g ⁻¹)			
	Granulado de caldo de carne	Granulado de caldo de pollo	Pastillas de caldo (A)	Pastillas de caldo (B)
NH	56.0	7.76	d. / n. c.	65.6
H	6.65	d. / n. c.	d. / n. c.	3.92
Trp-P-2	2.03	3.13	d. / n. c.	d. / n. c.
PhIP	7.42	n. d.	n. d.	d. / n. c.
Trp-P-1	4.02	d. / n. c.	d. / n. c.	d. / n. c.
AαC	d. / n. c.	d. / n. c.	d. / n. c.	d. / n. c.
MeAαC	d. / n. c.	d. / n. c.	d. / n. c.	d. / n. c.

n. d. No detectado

n. c. No cuantificado

d. Detectado

Los valores encontrados oscilan entre 2.03 y 65.6 ng g⁻¹ para Trp-P-2 y NH, respectivamente. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores [34, 39]. Por otra parte, AαC y MeAαC fueron detectadas en todas las muestras pero no pudieron ser cuantificadas.

En el caso de las pastillas de caldo (A), todas las aminas fueron detectadas, excepto PhIP, pero a concentraciones inferiores a sus límites de cuantificación.

II.4 Determinación de Aminas Heterocíclicas utilizando microextracción en fase sólida acoplada a HPLC con detección electroquímica *versus* inyección directa

La detección electroquímica se ha empleado junto a la cromatografía líquida y a la electroforesis capilar, aunque no tan ampliamente como la detección Vis-UV y fluorescente. Teóricamente, los detectores electroquímicos podrían llegar a ser más sensibles y más selectivos que los de Vis-UV, ya que se trabaja a los potenciales en los que los analitos se oxidan o reducen, disminuyendo la probabilidad de que aquellas sustancias interferentes lo hagan también.

La mayoría de los grupos funcionales presentan algún grado de electroactividad, si el potencial aplicado es lo suficientemente alto. Las aminas heterocíclicas en general presentan un buen comportamiento electroquímico [40] debido a la presencia de su grupo amino, lo que ha permitido aplicar la detección electroquímica como un método de detección sensible y selectivo [41-45]. Por este motivo, en este estudio se han incluido las 10 AHs consideradas en el apartado II.2 y la Glu-P-2.

En todas las aplicaciones referidas a la determinación de las AHs mediante HPLC-detección electroquímica descritas en la bibliografía, las aminas deben separarse en dos grupos atendiendo a su polaridad, llevándose a cabo su determinación con el uso de dos condiciones cromatográficas diferentes, una para las aminas polares y otra para las menos polares. En ese sentido, uno de los objetivos principales de este apartado es encontrar una metodología cromatográfica que nos permita determinar las AHs polares y no polares en una única experiencia, con la consiguiente reducción del tiempo requerido para llevar a cabo el análisis cromatográfico.

II.4.1 Optimización de las condiciones cromatográficas

Optimización de la separación cromatográfica

La corriente resultante de la electrolisis de un analito depende de diferentes factores, de los cuales, el más importante es la concentración del analito. Otros factores son la temperatura, el área de la superficie del electrodo de trabajo y la velocidad de flujo, de estos los más importantes son la temperatura y la velocidad de flujo. El nivel de la línea base también depende de estos factores, por lo que para minimizar la deriva es necesario mantener constantes dichos factores. La velocidad de flujo viene regulada por el flujo de fase móvil que nos dan las bombas del sistema HPLC. Para trabajar a temperatura constante la celda electroquímica y la columna deben termostatzarse. El termostato del detector usado permite trabajar a una temperatura mínima de 5°C sobre la temperatura ambiente, por lo que la temperatura se fijó en 30°C.

Otro aspecto a tener en cuenta es que el electrodo de referencia usado es un electrodo Ag/AgCl *in situ* (ISAAC), que está en contacto directo con la fase móvil que debe contener los iones cloruro. La concentración de cloruro determina el potencial, por lo tanto, su concentración debe permanecer constante en la fase móvil. Como fuente de cloruros se añade a la fase móvil, sea cual sea su composición, KCl de tal manera que la concentración de cloruro sea en todo momento 2 mmol L⁻¹.

Como se ha comentado anteriormente, en la separación de las AHs mediante cromatografía líquida es necesaria la presencia de un aditivo en la fase móvil que desactive los grupos silanol libres de la fase estacionaria. En los apartados anteriores hemos empleado la trietilamina (TEA), que es el aditivo más comúnmente utilizado en HPLC para la determinación de AHs. Sin embargo, la TEA es electroquímicamente activa, por lo que no se puede emplear como aditivo cuando se utiliza la detección electroquímica. Algunos autores [41] recomiendan el uso de fases móviles isocráticas, consistentes en una disolución tamponada 50 mM de acetato amónico – ácido acético, a diferentes pH y porcentajes de acetonitrilo dependiendo de si estamos considerando la fracción polar o menos polar de AHs.

Como se ha indicado, uno de los principales objetivos de este apartado es la determinación cromatográfica de las AHs con detección electroquímica en un único cromatograma. Para encontrar las condiciones cromatográficas adecuadas, como punto de partida se eligieron fases móviles compuestas por 50 mM acetato amónico-ácido acético, pH

4 y porcentajes de acetonitrilo del 30 y el 10% y la columna TSK-gel-ODS-80TM 5 μ m, 150 x 4.6 mm d.i.) e inyectamos las AHs por separado para determinar sus tiempos de retención. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.4.1.

Tabla II.4.1. Tiempos de retención obtenidos para las AHs con distintas composiciones de fase móvil.

Compuesto	50 mM acetato amónico – ácido acético, pH 4 : ACN (7:3)	50 mM acetato amónico – ácido acético, pH 4 : ACN (9:1)
	Tiempo de retención (min)	Tiempo de retención (min)
MeIQx	2.89	16.2
IQ	3.22	12.2
MeIQ	3.73	18.7
H	5.97	-
Trp-P-2	6.03	-
NH	7.24	-
A α C	12.5	-
MeA α C	12.6	-

(-) $t_R > 50$ minutos

Como puede observarse, para un porcentaje de acetonitrilo del 30%, existen algunas coeluciones. En primer lugar, las AHs polares no se separan, y tampoco lo hacen A α C y MeA α C. En cambio, para un porcentaje de acetonitrilo del 10%, se obtiene una buena separación de las aminas polares, mientras que las aminas menos polares presentaban tiempos de retención superiores a 50 minutos y no fueron registradas.

En la búsqueda de unas condiciones cromatográficas que permitan la determinación de las 11 AHs en un único cromatograma, centrando la atención en las aminas menos polares, estudiamos la influencia del pH y del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil. Asimismo, para favorecer la separación de las aminas, añadimos otra columna exactamente igual a la que habíamos empleado hasta ahora (TSK-gel-ODS-80TM 5 μ m, 150 x 4.6 mm d.i.) conectada en serie con la anterior.

La Figura II.4.1 muestra los cromatogramas obtenidos, para las AHs menos polares, cuando el pH de la fase móvil se varía entre 5.5 y 6.75, manteniendo un porcentaje de

acetonitrilo del 25% en todos los casos. Los resultados muestran que para las aminas menos polares, un pH de 6 en la fase móvil parece ser el más adecuado. Mientras que las aminas polares se ven beneficiadas cuando el pH de la fase móvil es inferior a 6.

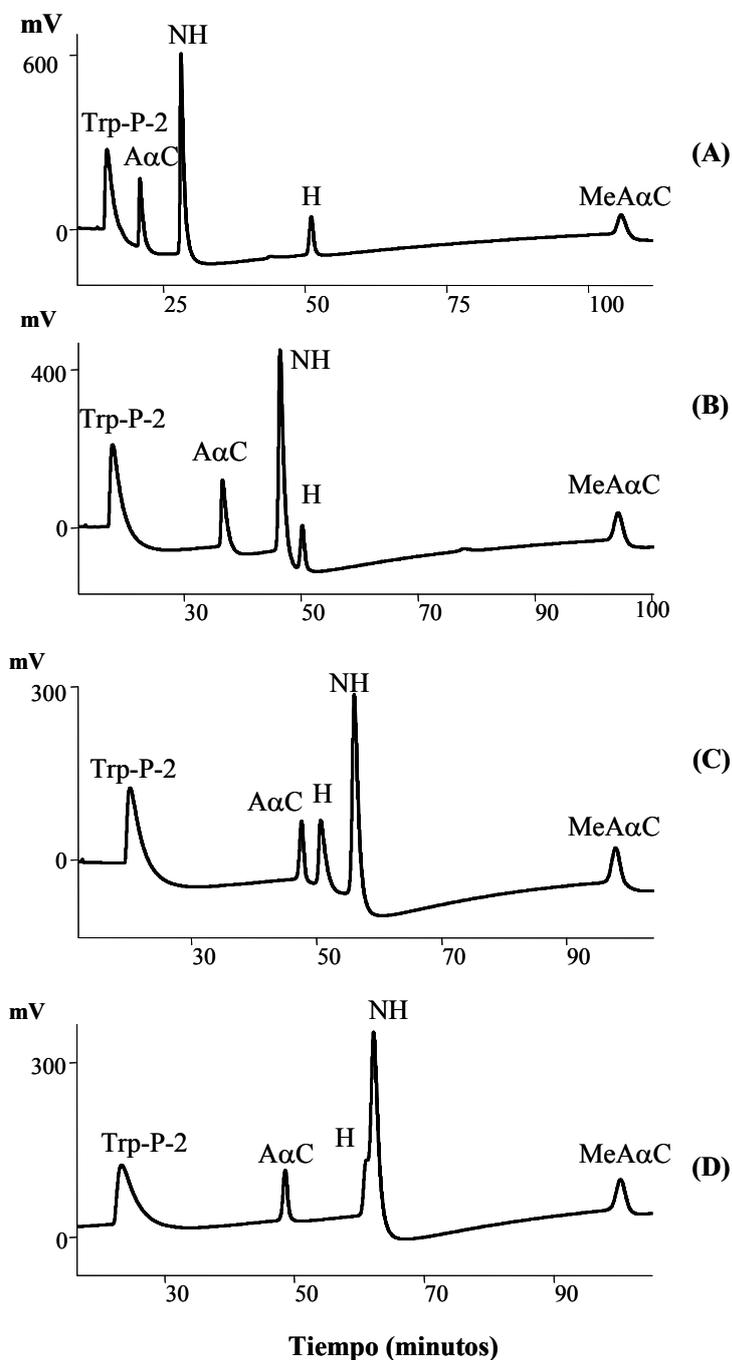


Figura II.4.1. Influencia del pH en la separación de las AHs menos polares, manteniendo un porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil del 25%. (A) pH 5.5, (B) pH 6.0, (C) pH 6.5 y (D) pH 6.75.

Por otra parte, la Figura II.4.2 muestra los cromatogramas obtenidos, para las AHs menos polares, para diferentes porcentajes de acetonitrilo en la fase móvil, manteniendo un pH próximo a 6 en todos los casos. Los resultados reflejan que para las aminas menos polares, altos contenidos en acetonitrilo favorecen su elución, dando lugar a tiempos de retención más cortos. Mientras que las aminas más polares se ven favorecidas, es decir, aumenta la resolución de sus picos, cuando el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil es bajo.

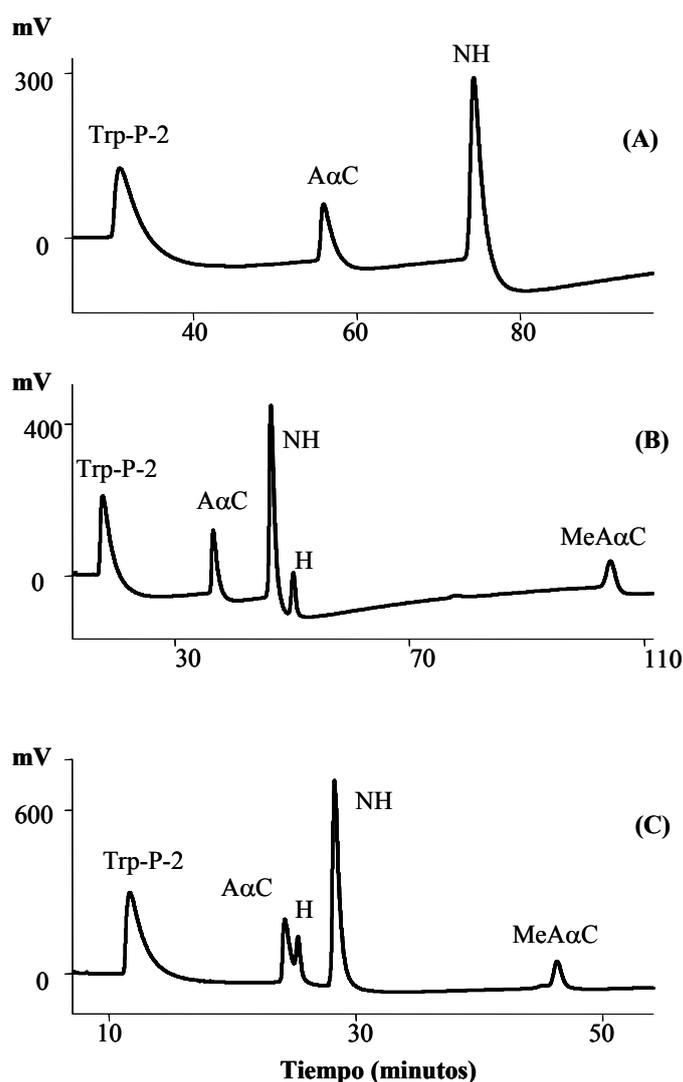


Figura II.4.2. Influencia del porcentaje de acetonitrilo en la separación de las aminas menos polares. (A) 20% ACN, (B) 25% ACN y (C) 30% ACN.

Si se tienen en cuenta los diferentes comportamientos que presentan las aminas estudiadas frente al porcentaje de acetonitrilo y al pH en la fase móvil, parece difícil encontrar una composición de fase móvil que nos permita trabajar en modo isocrático para la separación de todas las aminas en un mismo cromatograma. Las aminas polares y las no polares necesitan condiciones diferentes para su separación cromatográfica: para las primeras, bajos valores de pH y bajos porcentajes de acetonitrilo, y para las segundas, porcentajes más altos de acetonitrilo y valores de pH superiores.

En la bibliografía no es frecuente encontrar trabajos que apliquen un gradiente de elución cuando se trabaja con detección electroquímica, y en todos los casos se observan grandes modificaciones en la línea base de los cromatogramas. Algunos autores [42, 47] justifican estas modificaciones al cambio en la concentración de KCl que se produce al ir aumentando el porcentaje de disolvente orgánico, para favorecer la elución de aquellos compuestos con mayor afinidad por la fase estacionaria.

Para conseguir, por una parte, que la concentración de KCl en la fase móvil permanezca constante, y por otra, disminuir el tiempo cromatográfico, se ha llevado a cabo la elución con un gradiente ternario. Para ello, se preparan las siguientes mezclas en tres de los reservorios para fase móvil del sistema de bombas para HPLC: (A) 50 mM acetato amónico – ácido acético (pH 4) : acetonitrilo (9:1), para la elución de las aminas polares; (B) 50 mM acetato amónico – ácido acético (pH 6) : acetonitrilo (7:3), para la elución de las aminas menos polares y (C) 50 mM acetato amónico-ácido acético (pH 6) : acetonitrilo (6:4) para favorecer la elución de las aminas A α C y MeA α C, que presentan altos tiempos de retención, 56 y 79 minutos, respectivamente, si solamente se emplea un gradiente binario formado por A y B. Este tiempo de transición entre eluyentes debe fijarse cuidadosamente para que la deriva que se produce en la línea base no interfiera en la separación y permita la integración y cuantificación de todos los picos cromatográficos. En la Tabla II.4.2 se recoge el gradiente propuesto.

En las condiciones establecidas, el tiempo total del método cromatográfico es de 63 min. Cuando se emplean dos condiciones diferentes, y con el mismo tipo de columnas que hemos empleado [41], el tiempo total es de 80 min: 50 min (AHs polares) más 30 min (AHs menos polares), sin tener en cuenta el tiempo necesario para equilibrar el sistema entre los dos métodos. Por lo tanto, hemos obtenido una importante disminución en el tiempo cromatográfico con el método propuesto.

Tabla II.4.2. Programa de gradiente y potencial aplicado para la separación de las AHs mediante HPLC con detección electroquímica.

Compuesto	Tiempo (min)	Composición de la fase móvil			E (mV)
		% A	% B	% C	
Glu-P-2 IQ MeIQ	0	100			+1000
	27	100			
MeIQx	30		100		+950
NH H Trp-P-2 Trp-P-1	44		100		
	45			100	
PhIP A α C MeA α C	63			100	

A = 50 mM acetato amónico-ácido acético (pH 4) : acetonitrilo (9:1)

B = 50 mM acetato amónico-ácido acético (pH 6) : acetonitrilo (7:3)

C = 50 mM acetato amónico-ácido acético (pH 6) : acetonitrilo (6:4)

Elección del potencial de trabajo

Una vez optimizado el gradiente de elución, se ha de elegir el potencial de trabajo. Atendiendo a los datos encontrados en la bibliografía, los potenciales que normalmente se aplican en la detección electroquímica de las AHs están comprendidos entre +850 y +1000 mV [41, 46]. En nuestro caso se ha de tener en cuenta que las AHs pertenecen a dos grupos bien diferenciados (aminas polares y no polares) y que su separación cromatográfica se lleva a cabo con diferentes composiciones de la fase móvil.

Los potenciales óptimos de trabajo se han obtenido a partir de las representaciones de las áreas de los picos cromatográficos de las aminas frente al potencial aplicado en las condiciones cromatográficas optimizadas. Estos gráficos se obtienen midiendo las áreas de cada compuesto obtenidas en cromatogramas en los cuales se varía el potencial de trabajo entre +800 y +1200 mV. En la Figura II.4.3 se muestra la representación del área de pico *vs* potencial aplicado para la amina NH como ejemplo representativo.

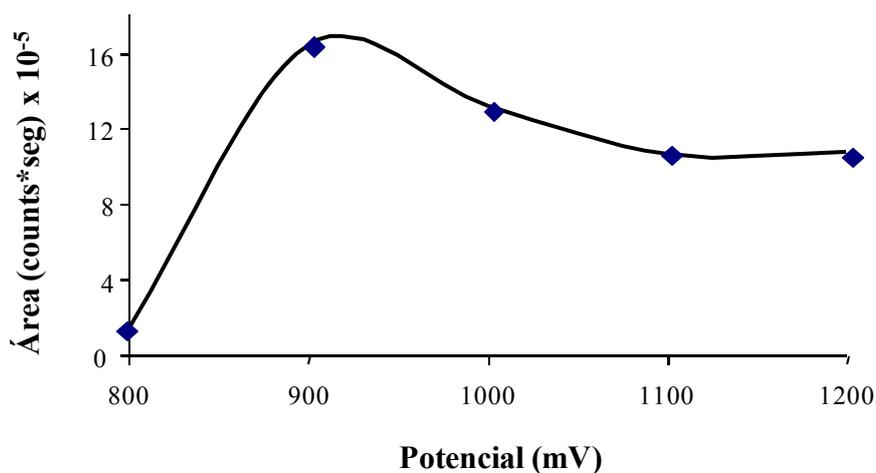


Figura II.4.3. Área de pico vs potencial aplicado para NH en la fase móvil 50 mM acetato amónico-ácido acético (pH 6) : acetonitrilo (7:3).

A partir de estas representaciones gráficas y de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores, elegimos como potenciales de trabajo +1000 mV para las aminas polares y +950 mV para las menos polares. La Figura II.4.4 muestra un cromatograma representativo obtenido usando las condiciones cromatográficas optimizadas. Los estudios de reproducibilidad muestran que los tiempos de retención de las distintas aminas, presentan desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0.40% para Trp-P-1 y 7.27% para IQ (n = 11).

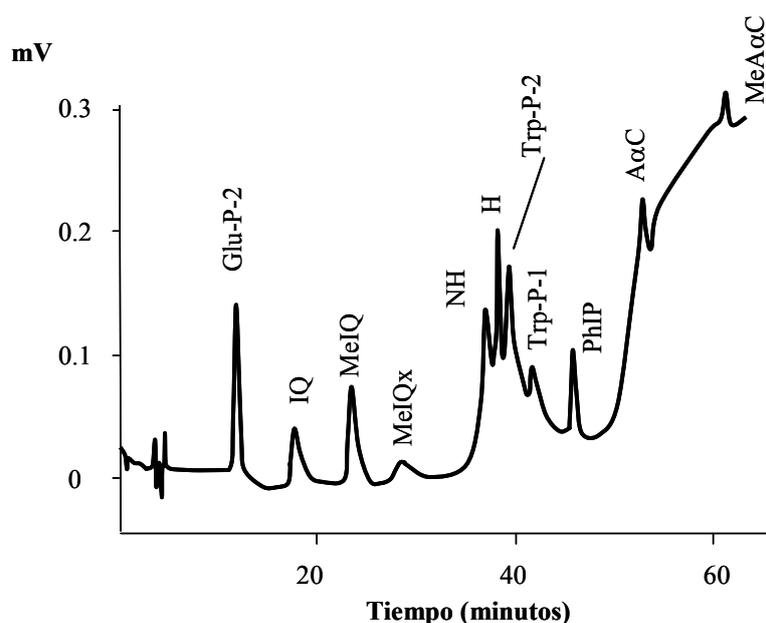


Figura II.4.4. Cromatograma correspondiente a una disolución de AHs con detección electroquímica en las condiciones optimizadas.

II.4.2 SPME-HPLC-detección electroquímica

En el apartado de SPME-HPLC con detección Vis-UV, se ha llevado a cabo la optimización de la metodología SPME usando una fibra con el recubrimiento de CW-TPR. De acuerdo con los resultados obtenidos en dicho proceso de optimización y con las 11 aminas incluidas en este apartado, las condiciones experimentales óptimas son: $t_{\text{abs}} = 15$ min, $t_{\text{imm}} = 15$ min y $t_{\text{des}} = 1$ min. Sin embargo, en este caso se ha de elegir el disolvente de desorción adecuado, teniendo en cuenta la naturaleza de las aminas estudiadas.

Los disolventes de desorción estudiados fueron: metanol, agua MilliQ a pH 3.2, agua MilliQ (pH 3.2) : acetonitrilo (95:5) y la fase móvil inicial (50 mM acetato amónico (pH 4) : acetonitrilo, 90:10). En la Figura II.4.5 se comparan las eficiencias de desorción, expresadas como áreas de pico, obtenidas con los diferentes disolventes de desorción para algunas aminas representativas.

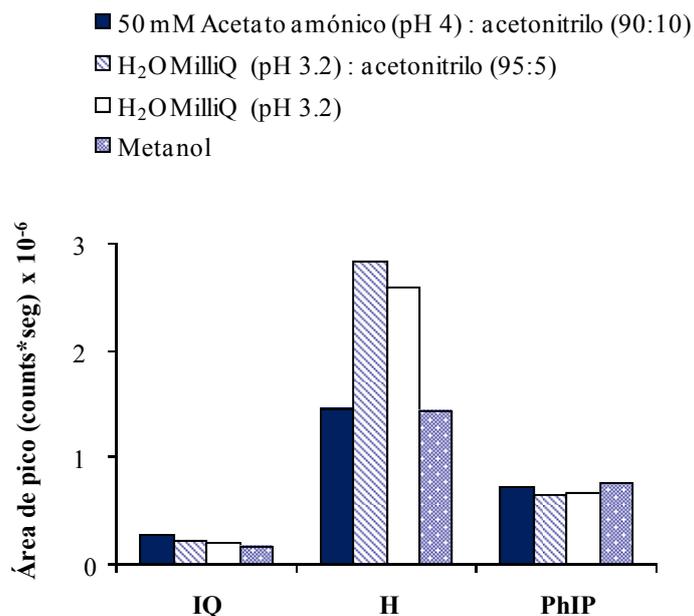


Figura II.4.5. Eficiencias de desorción, expresadas como áreas de pico, obtenidas con los diferentes disolventes de desorción para algunas aminas representativas.

Como puede observarse en la figura, las aminas siguen el comportamiento esperado y que ya se había comentado en los apartados anteriores. Es decir, el mejor disolvente de desorción para las aminas polares (IQ) es la fase móvil inicial (50 mM acetato amónico (pH 4) : ACN, 90:10). A medida que va disminuyendo la polaridad de las aminas, el metanol es el mejor disolvente de desorción (PhIP). Para aminas con una polaridad intermedia (H) con agua Milli-Q a pH 3.2 y con un 5% de acetonitrilo, se obtienen las eficiencias de desorción más altas.

Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó como disolvente de desorción la fase móvil inicial, ya que, además de ventajas prácticas, se favorece la desorción de las aminas polares, que muestran una mayor apetencia por la fase polimérica. En la Figura II.4.6 se muestra un cromatograma obtenido bajo las condiciones optimizadas.

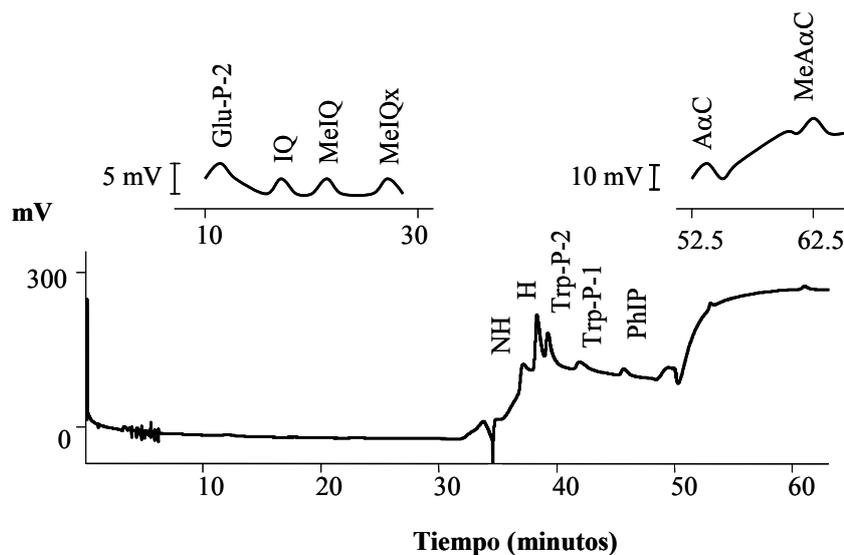


Figura II.4.6. Cromatograma correspondiente a una disolución de AHs analizada mediante el método SPME-HPLC con detección electroquímica optimizado.

Estudio del efecto memoria

Para estudiar el efecto memoria de la fibra de SPME con las AHs, utilizando como disolvente de desorción la fase móvil inicial, se llevaron a cabo estudios que consistían en lavar con porciones de 250 μL de fase móvil inicial, seguida de una desorción en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados muestran que después de dos lavados las únicas AHs para las que se mostraba efecto memoria eran A α C y MeA α C, las aminas menos polares.

Para tratar de eliminar este efecto memoria debido a las AHs menos polares, se llevó a cabo un segundo estudio de este efecto, en el cual los lavados de la fibra se realizaron con porciones de 250 μL de la composición de la fase móvil a la cual se eluyen estas aminas (50 mM acetato amónico-ácido acético (pH 6) : ACN, 6:4). Los resultados encontrados muestran que con dos lavados ya no existe efecto memoria para ninguna de las AHs estudiadas.

Curvas de calibrado del método SPME-HPLC-detección electroquímica optimizado

Una vez optimizados los parámetros del método SPME-HPLC con detección electroquímica se procedió a realizar las curvas de calibrado para cada una de las AHs. En este punto se hicieron evidentes dos importantes problemas que ya habían sido detectados por otros autores [48, 49]. Por una parte, una pobre repetitividad de las áreas de pico para la mayoría de los compuestos. En la Tabla II.4.3 se muestran las desviaciones estándar relativas (%) obtenidas para todas las AHs.

Tabla II.4.3. Desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidas para todas las aminas.

Aminas polares	RSD^a (%)	Aminas menos polares	RSD^a (%)
Glu-P-2	21.1	NH	14.5
IQ	15.1	H	5.74
MeIQ	5.50	Trp-P-2	20.9
MeIQx	16.0	Trp-P-1	5.77
		PhIP	22.5
		AαC	23.0
		MeAαC	19.1

^aDesviación estándar relativa para n = 4.

Por otra parte, se observa una marcada pérdida de linealidad en las respuestas obtenidas para la mayoría de las aminas en las curvas de calibrado. El rango lineal encontrado es muy corto, comparado con los obtenidos para los acoplamientos SPME-HPLC con las detecciones Vis-UV y fluorescencia. Si consideramos que estamos trabajando con rangos de concentraciones muy superiores a los utilizados con las detecciones citadas anteriormente, este comportamiento podría ser debido a una saturación de los puntos activos de la fibra y una competencia entre los analitos por ocupar dichos puntos [48]. En la Figura II.4.7 se muestran las curvas de calibrado obtenidas para AHs representativas. La figura muestra claramente que la respuesta alcanza los niveles de saturación.

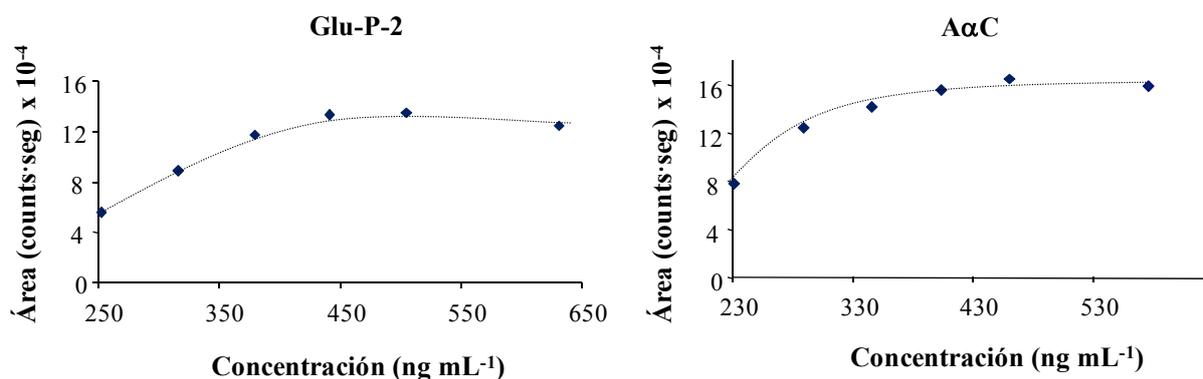


Figura II.4.7. Curvas de calibración empleando el método SPME-HPLC con detección electroquímica, donde se aprecia la pérdida de linealidad en los niveles de concentración superiores.

La concentración total de las 11 AHs estaba comprendida entre 1992 y 4980 ng mL⁻¹, mientras que en SPME-HPLC con detección Vis-UV estaba comprendida entre 261 y 1002 ng mL⁻¹, para 10 AHs y para la detección fluorescente, entre 2.65 y 26.5 ng mL⁻¹ para 7 AHs. Como puede observarse, debido a la baja sensibilidad del detector, en el caso de emplear la detección electroquímica la concentración de las aminas debe ser como mínimo 5 veces superior a la que se emplea con la detección Vis-UV.

Para estudiar el efecto de la saturación de la fibra, se analizan disoluciones que contenían una sola amina, H, a diferentes concentraciones. La Figura II.4.8 muestra las áreas de pico encontradas. Como puede observarse, al pasar de una concentración de 600 a 1300 ng mL⁻¹, el área de pico encontrada aumenta ligeramente, lo que sugiere la saturación de la fibra.

Para confirmar la saturación de la fibra, se conecta el detector de fluorescencia en serie con el electroquímico, y se procede a estudiar de nuevo el efecto memoria, observándose que después de 20 lavados todas las aminas permanecen retenidas, llegando a saturar la señal del detector de fluorescencia. Este hecho no es visible en la señal del detector electroquímico, tal como comentamos en el estudio del efecto memoria.

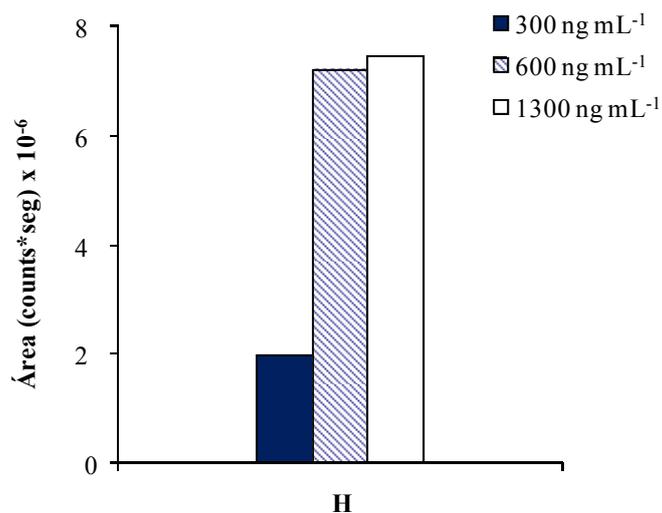


Figura II.4.8. Áreas de pico obtenidas a diferentes concentraciones de H, empleando $t_{\text{abs}} = 15$ min y $t_{\text{imm}} = 15$ min y la fase móvil inicial (50 mM acetato amónico – ácido acético (pH 4) : ACN (9:1)) como disolvente de desorción.

Una vez demostrada la saturación de la fibra SPME debido a las altas concentraciones necesarias para la detección electroquímica y la imposibilidad de emplear concentraciones menores debido a la baja sensibilidad que presenta este detector, se eligió la inyección directa para posteriores análisis de AHs mediante HPLC con detección electroquímica.

II.4.3 Parámetros de calidad del método analítico HPLC con detección electroquímica mediante inyección directa

Utilizando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente se evaluó el procedimiento analítico propuesto usando inyección directa. La Tabla II.4.4 muestra la pendiente, desviación estándar de la regresión, rango de linealidad de las curvas de calibrado, precisión intermedia y límites de detección del método.

Tabla II.4.4. Parámetros de calidad del método HPLC con detección electroquímica

Compuesto	Rango de linealidad (ng inyectados)	(Pendiente \pm SD) $\times 10^{-6}$	S _{y/x}	R	RSD ^a (%)	LD (ng inyectados)
Glu-P-2	16 - 50	1.95 \pm 0.05	68632	0.998	7.4 (20)	1.98
IQ	16 - 50	2.11 \pm 0.05	62249	0.998	10.4 (20)	1.66
MeIQ	16 - 50	2.16 \pm 0.03	44388	0.999	6.9 (20)	1.15
MeIQx	16 - 50	1.24 \pm 0.02	18322	0.999	12.8 (20)	0.83
NH	16 - 50	0.49 \pm 0.02	23688	0.996	10.4 (20)	2.68
H	6.0 - 16	2.3 \pm 0.1	46476	0.997	8.2 (6.7)	1.13
Trp-P-2	6.0 - 16	1.74 \pm 0.04	12841	0.999	12.5 (6.7)	0.41
Trp-P-1	6.0 - 16	0.896 \pm 0.006	2481	0.999	7.7 (6.7)	0.16
PhIP	12 - 30	1.13 \pm 0.03	19799	0.999	6.1 (14)	0.98
A α C	16 - 50	0.07 \pm 0.02	1904	0.996	12.7 (20)	1.62
MeA α C	16 - 50	0.073 \pm 0.002	2779	0.997	8.4 (20)	2.14

^aPrecisión Intermedia: Se analizaron 3 muestras en 3 días consecutivos. Los valores entre paréntesis indican la concentración (ng inyectados) utilizada.

Todas las aminas muestran una buena linealidad con coeficientes de correlación (R) comprendidos entre 0.996 y 0.999. Los rangos de trabajo fueron de 6-16 ng inyectados para H, Trp-P-2 y Trp-P-1; 12-30 ng para PhIP; y 16-50 ng para el resto de las AHs. La precisión intermedia se evaluó analizando 4 disoluciones con concentraciones indicadas en la Tabla II.4.4 durante tres días no consecutivos bajo las condiciones optimizadas. Las desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidas oscilan entre 6.1 y 12.8%, mostrando la reproducibilidad del método propuesto.

Los límites de detección (LD) se calcularon de acuerdo con el procedimiento descrito por Cuadros *et al.* [50]. Estos límites oscilan entre 0.16 ng inyectados para Trp-P-1 y 2.68 ng inyectados para NH. Estos límites de detección son ligeramente mejores que los obtenidos por otros autores empleando HPLC con detección electroquímica [41].

II.4.4 Determinación de AHs en extractos de carne comerciales mediante una extracción asistida por microondas focalizadas

En el apartado II.3.3, los estudios encaminados a establecer las condiciones apropiadas para la extracción de las AHs contenidas en extractos de carne comerciales, se llevaron a cabo utilizando un baño de ultrasonidos de potencia fija y a una temperatura de 45°C. Los inconvenientes de trabajar con este procedimiento es que es necesario realizar una segunda extracción y no se produce la total solubilización del extracto. Para solventar estos inconvenientes planteamos la extracción asistida por microondas focalizadas como alternativa a la extracción mediante ultrasonidos.

La extracción asistida por microondas proporciona técnicas selectivas y rápidas en las que se obtienen recuperaciones mejores o similares a las obtenidas en los procesos de extracción convencionales. Además, ofrece otras ventajas sobre las tecnologías utilizadas normalmente: un menor consumo de energía, menores volúmenes de disolventes, menor toxicidad de los disolventes empleados y, en general, menor cantidad de residuos.

La extracción asistida por microondas ha demostrado ser una herramienta analítica muy útil para la extracción de analitos desde muestras sólidas, principalmente por sus eficiencias de extracción y los bajos tiempos de extracción requeridos con esta técnica [51, 52]. En este sentido, parece interesante hacer uso de esta técnica para el análisis de las AHs,

con el objetivo, no sólo de disminuir los tiempos experimentales requeridos en los tediosos procedimientos descritos para su extracción [53], sino también para obtener apropiadas eficiencias de extracción en muestras complejas. Se han seleccionado las microondas focalizadas en lugar de las microondas convencionales por presentar ventajas como una mayor seguridad al operar a presión atmosférica o la posibilidad de utilizar una adición programada de reactivos en cualquier momento durante el proceso de extracción [54].

La optimización de la extracción asistida por microondas focalizadas se llevó a cabo mediante diseños experimentales. Como se ha comentado anteriormente, el uso de un diseño factorial para estudiar las variables que afectan a un sistema permite considerar la totalidad de las experiencias y las posibles interacciones entre las variables.

Las variables que potencialmente podrían afectar al proceso de extracción asistida por microondas focalizadas son: la potencia del microondas, la temperatura máxima a alcanzar dentro del recipiente y el tiempo en el cual la temperatura máxima se mantiene constante. Los niveles de los factores se eligieron, como una primera aproximación, de acuerdo con experiencias previas realizadas.

Otras variables implicadas en el proceso de extracción se mantuvieron constantes e iguales a las empleadas con la extracción asistida por ultrasonidos. Estas variables son: la cantidad de muestra (1 g de extracto de carne), el volumen de la fase extractante (6 mL) y la concentración de las AHs.

Como una primera aproximación se seleccionó un diseño factorial 2^3 que da lugar a 8 experiencias. Los niveles utilizados para cada variable se muestran en la Tabla II.4.5.

Tabla II.4.5. Niveles de los factores en el diseño previo.

Factor	Clave	Menor (-)	Mayor (+)
Potencia microondas (W)	A	20	150
Tiempo (min)	B	0.5	4
Temperatura máx. (°C)	C	35	80

No se seleccionaron temperaturas superiores a 80°C no sólo para evitar pérdidas de la fase extractante por volatilización, sino principalmente para prevenir la formación de AHs durante el calentamiento. Por otra parte, la potencia de microondas máxima se fijó en 150 W,

puesto que potencias superiores están asociadas a resultados poco reproducibles, debido a los cortos tiempos de extracción requeridos para alcanzar la temperatura máxima.

Debido a que uno de los objetivos planteados al proponer una extracción asistida por microondas era la disminución del tiempo de extracción, no parece aconsejable la elección de tiempos superiores a 4 min. Como respuesta para el diseño se seleccionaron las áreas de los picos de cada una de las AHs, llevándose a cabo las extracciones con muestras de granulado de caldo de carne enriquecidos tal y como se describe en el apartado IV.4.1 de la Parte Experimental.

La matriz del diseño experimental aplicado se muestra en la Tabla II.4.6. Los resultados obtenidos permiten clasificar las aminas en dos grupos diferentes considerando su comportamiento frente a los factores considerados. Un primer grupo está formado por las aminas Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, H y NH, grupo en el que están incluidas las aminas más polares. El segundo grupo está formado por las aminas menos polares Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, AαC y MeAαC. Las aminas H y PhIP fueron seleccionadas como ejemplos de cada grupo.

Tabla II.4.6. Matriz del diseño factorial.

Experiencia	Potencia microondas (W)	Tiempo (min)	Temperatura máx. (°C)
1	150	3	50
2	40	1	50
3	150	3	80
4	40	1	80
5	40	3	80
6	150	1	50
7	40	3	50
8	150	1	80

La Figura II.4.9 (A) muestra las Cartas de Pareto, en las cuales se evalúan los efectos principales y las interacciones [55], obtenidas al analizar los resultados del diseño experimental para las aminas representativas. En esta clase de gráficos, las barras son proporcionales al valor absoluto de los efectos estimados, ayudando a comparar la importancia relativa de los efectos. Puede observarse que para las aminas menos polares la temperatura y el tiempo tienen un efecto positivo en la respuesta, al contrario que la potencia

de microondas. Por otra parte, para el grupo de las aminas más polares, todos los factores tienen un efecto positivo.

La Figura II.4.9 (B) muestra las interacciones entre los factores, observándose una interacción entre el tiempo y la temperatura para ambos grupos, siendo esta interacción el factor más importante para las aminas menos polares. Para estas aminas el máximo se alcanza con el nivel bajo para el tiempo y el nivel más alto para la temperatura. El máximo también se alcanza con el nivel más alto para la temperatura en el caso de las aminas polares. Considerando estos resultados, la temperatura óptima seleccionada es de 80°C, el valor más alto para la temperatura.

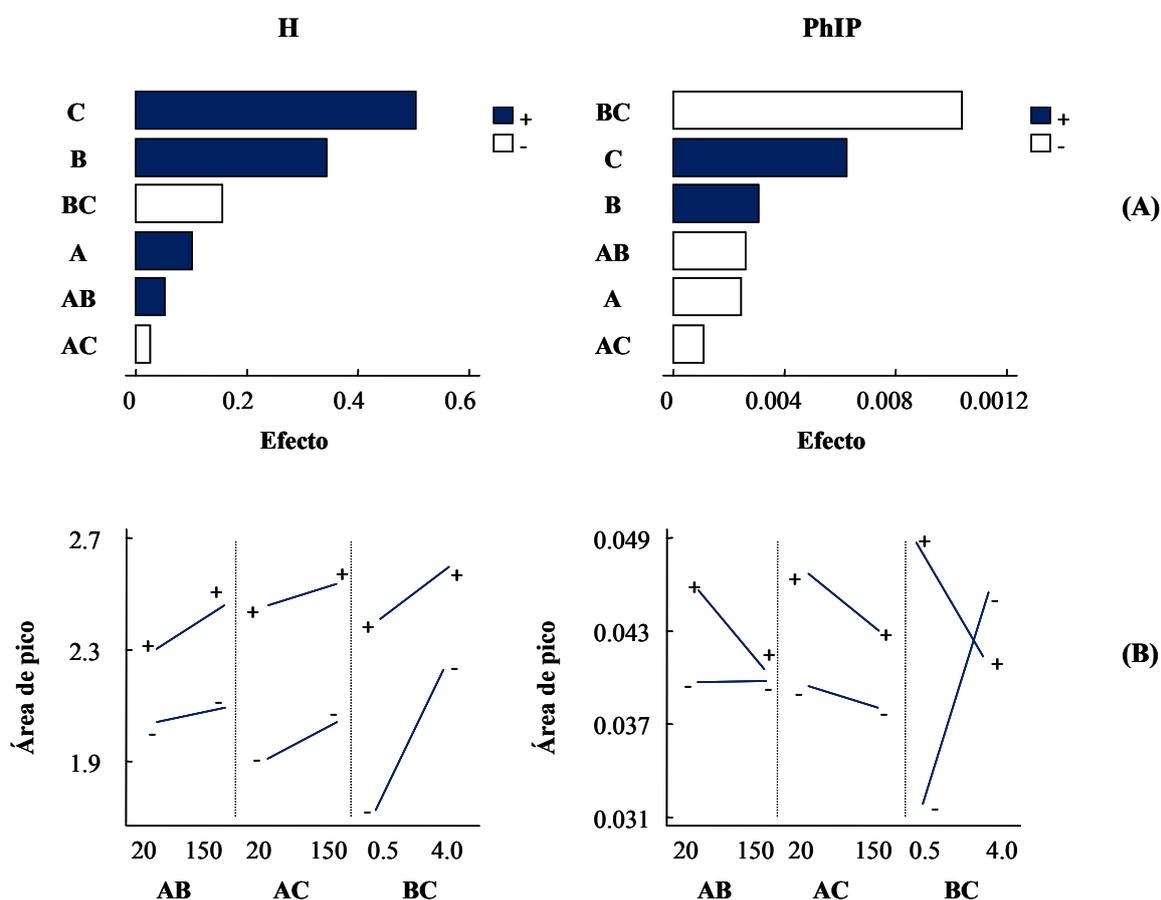


Figura II.4.9. Cartas de Pareto de efectos (A) e interacciones entre los factores (B) para H y PhIP como aminas representativas. Factores: A= Potencia de microondas, B= Tiempo y C= Temperatura máxima.

Con objeto de estudiar el efecto de las interacciones entre la potencia de las microondas y el tiempo, y obtener los valores óptimos para estas variables, se llevó a cabo una serie de experimentos, centrando la atención en las aminos menos polares. Normalmente, estas aminos menos polares presentan las eficiencias de extracción más bajas [46].

Se estudiaron tres valores bajos para el tiempo: 0.5, 1 y 1.5 min. Esta decisión se tomó considerando no solo sus efectos negativos en todas las aminos estudiadas sino también para disminuir el tiempo de extracción necesario en este proceso. Se emplearon dos potencias de microondas diferentes: 20 y 150 W, manteniendo constante la temperatura optimizada: 80 °C. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura II.4.10, para las aminos Trp-P-1 y PhIP como ejemplos de las aminos menos polares.

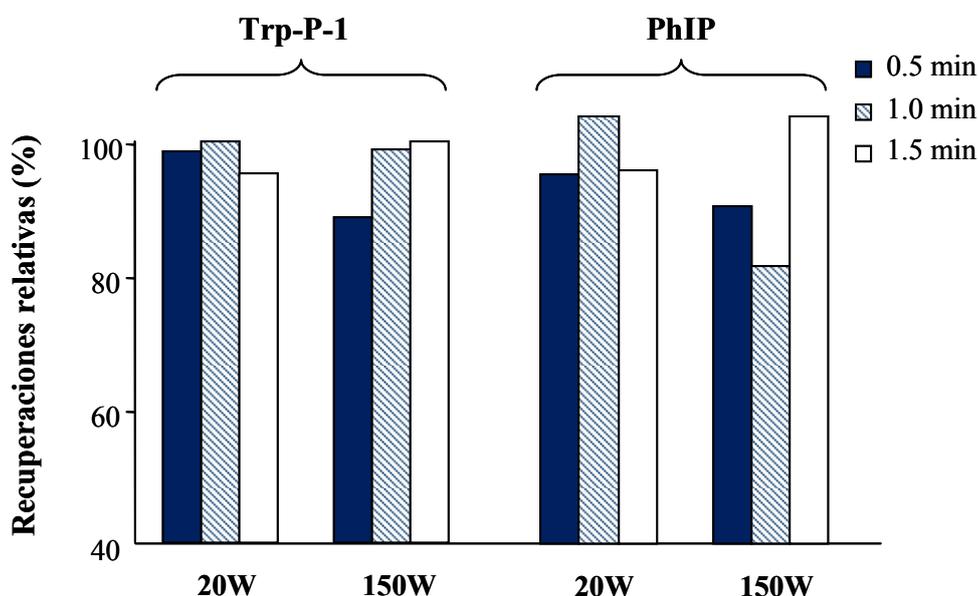


Figura II.4.10. Eficiencias de extracción para las aminos Trp-P-1 y PhIP a diferentes tiempos y potencias, manteniendo constante la temperatura máxima a 80°C.

Puede observarse una baja influencia del tiempo cuando se emplean potencias bajas de microondas. Asimismo se observa un ligero aumento en la respuesta cuando se incrementa el tiempo de extracción usando niveles altos para la potencia de microondas. Este ligero aumento puede atribuirse a los bajos tiempos de irradiación necesarios para alcanzar la temperatura máxima y por lo tanto, es necesario un tiempo extra de irradiación.

Atendiendo a los resultados obtenidos, el tiempo y la potencia de microondas seleccionados fueron 1 minuto y 20 W, respectivamente, con el objetivo de aumentar la efectividad del tiempo de acción de las microondas, y, por lo tanto, la eficiencia de la extracción. En estas condiciones, el tiempo total de extracción por microondas es de aproximadamente 5 minutos, resaltándose los tiempos cortos de extracción que son necesarios con el método propuesto.

Determinación de AHs mediante HPLC con detección electroquímica

Se analizaron cinco clases diferentes de extractos de carne comerciales: granulado de caldo de carne, concentrado de caldo de carne, granulado de caldo de pollo y dos clases diferentes de pastillas de caldo (A y B). La evaluación de las eficiencias de extracción se llevó a cabo en las condiciones óptimas con 3 porciones enriquecidas de las muestras, tal y como se describe en el apartado IV.4.1 de la Parte Experimental. Las recuperaciones obtenidas se recogen en la Tabla II.4.7.

Los valores de las recuperaciones obtenidas oscilan entre 36.0% para PhIP en las pastillas de caldo A y 109.5% para Trp-P-1 en el concentrado de caldo de carne, encontrándose que la recuperación media es de 69.7% para todas las AHs en todos los extractos de carne estudiados.

La amina Glu-P-2 no puede ser cuantificada apropiadamente en el concentrado de caldo de carne y en las pastillas de caldo A y B, debido a la presencia de algunas impurezas con los mismos tiempos de retención que esta amina. Trp-P-2 y MeA α C presentan este mismo problema en las pastillas de caldo A y B.

Tabla II.4.7. Recuperaciones de las muestras enriquecidas.

Compuesto	Recuperación (%) ± SD ^a					
	Granulado de caldo de carne	Concentrado de caldo de carne	Granulado de caldo de pollo	Pastilla de caldo (A)	Pastilla de caldo (B)	
Glu-P-2	77.6 ± 9.0	-	64.1 ± 4.1	-	-	-
IQ	77.2 ± 4.4	58.1 ± 6.5	72.5 ± 1.3	71.7 ± 1.7	63.8 ± 1.6	
MeIQ	83.3 ± 12.7	81.9 ± 14.5	67.2 ± 1.3	57.9 ± 1.0	59.3 ± 1.5	
MeIQx	101.3 ± 3.8	96.3 ± 4.4	86.2 ± 2.1	75.3 ± 1.4	73.2 ± 2.7	
NH	85.1 ± 12.1	100.0 ± 2.3	81.0 ± 19.6	70.2 ± 2.0	65.4 ± 7.4	
H	92.2 ± 12.6	62.8 ± 7.8	60.9 ± 18.6	47.6 ± 3.5	53.0 ± 3.2	
Trp-P-2	57.5 ± 2.1	50.8 ± 6.7	-	-	-	
Trp-P-1	71.7 ± 2.8	109.5 ± 8.8	71.3 ± 17.0	70.7 ± 12.4	93.7 ± 2.9	
PhIP	77.3 ± 3.1	60.3 ± 7.3	55.4 ± 4.3	36.0 ± 5.0	52.0 ± 4.4	
AαC	92.9 ± 2.6	80.4 ± 12.6	65.0 ± 3.3	53.0 ± 3.7	49.9 ± 6.1	
MeAαC	76.9 ± 2.6	63.3 ± 8.1	43.5 ± 3.5	-	-	

^aDesviación estándar para n = 3

Para todas las aminas se obtienen buenas recuperaciones, mayores del 51% en los granulados de caldo de carne y de pollo y concentrado de caldo de carne, y también para el granulado de caldo de pollo con la excepción, en este último caso, de MeA α C. Las recuperaciones más bajas se obtienen para las pastillas de caldo A y B, comprendidas entre 47.6 y 93.7%, con la excepción de PhIP en las pastillas de caldo A. Estas diferencias revelan una gran dependencia entre el proceso de extracción y la naturaleza de la matriz de las muestras, especialmente para las aminas menos polares.

Las mejores eficiencias de extracción se encontraron para el granulado de caldo de carne, ya que la optimización del método se llevó a cabo con esta muestra. En vista de los resultados obtenidos, se requieren algunas mejoras en el proceso de extracción con las otras clases de muestras, especialmente con las pastillas de caldo A y B, para obtener mejores eficiencias de extracción.

Finalmente, debemos destacar que para las aminas PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2 y A α C las recuperaciones obtenidas son elevadas, teniendo en cuenta que su extracción ha sido descrita como problemática [56, 57].

Determinación de AHs mediante SPME-HPLC con detección fluorescente

Una vez tratados los extractos de carne comerciales con microondas focalizadas, según el método optimizado anteriormente, planteamos la utilización de SPME-HPLC con detección fluorescente, por ser el método que menores límites de detección y mayor selectividad y sensibilidad presenta. En este caso, las aminas que se analizan son las aminas menos polares (Glu-P-2, NH, H, Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, A α C y MeA α C). Para la separación cromatográfica se procede tal y como se indica en el apartado IV.3.1 de la Parte Experimental para determinar la cantidad de AHs presentes en los extractos mediante la detección fluorescente.

En la Tabla II.4.8 se muestran las cantidades de AHs (ng g^{-1}) encontradas en diferentes extractos de carne comerciales.

Tabla II.4.8. Concentración de las AHs en muestras de extractos de carne comerciales.

Compuesto	Concentraciones (ng g ⁻¹)		
	Granulado de caldo de carne	Granulado de caldo de pollo	Pastilla de caldo (A)
Glu-P-2	29.6	6.05	2.20
NH	170.2	40.8	10.1
H	34.3	5.91	2.53
Trp-P-2	4.62	0.94	0.89
PhIP	45.7	13.9	7.74
Trp-P-1	4.47	0.77	1.00
AαC	2.04	1.83	4.97
MeAαC	1.62	0.42	0.45

Como puede observarse en la tabla anterior, todas las aminos pueden detectarse y cuantificarse, siendo NH y H las aminos que se encuentran en mayor cantidad en todas las muestras. En las muestras de granulados de caldo, tanto de carne como de pollo todas las aminos, excepto AαC, se encuentran en mayor cantidad que en las pastillas de caldo. Esto puede deberse a la propia naturaleza de las muestras y a los métodos de fabricación, o también a que las pastillas de caldo presentan un contenido graso superior al de las muestras granuladas, y el paso criogénico para su eliminación no sea suficiente, con lo cual el recubrimiento de la fibra se envenena con la grasa presente en estas muestras.

II.5 Bibliografía

- [1] J. Pawliszyn. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*. Willey-VCH Inc., New York, (1997).
- [2] Z. Mester, R. Sturgeon, J. Pawliszyn. *Spectrochim. Acta Part B* 56 (2001) 233-260.
- [3] C. García, M. Llompart, M. Polo, C. Salgado, S. Macías, R. Cela. *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 277-285.
- [4] M. Llompart, K. Li, M. Fingas. *Talanta* 48 (1999) 451-459.
- [5] H. Lord, J. Pawliszyn. *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 153-193.
- [6] A.K. Malik, V. Kaur, N. Verna. *Talanta* 68 (2006) 842-849.
- [7] J.B. Quintana, I. Rodríguez. *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1447-1461.
- [8] F. Pragst. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1393-1414.
- [9] G. Ouyang, J. Pawliszyn. *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1059-1073.
- [10] J. Pawliszyn. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Royal Society of Analytical Chemistry (1999), Cambridge.
- [11] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batle. *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809-833.
- [12] S. Risticovic, V.H. Niri, D. Vuckovic, J. Pawliszyn. *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 781-795.
- [13] D. Louch, S. Motlagh, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 64 (1992) 1187-1199.
- [14] Z. Zhang, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 65 (1993) 1843-1852.
- [15] A. Navalón, A. Prieto, L. Araujo, J. L. Vilchez. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1100-1105.
- [16] T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn. *Analyst* 124 (1999) 643-649.
- [17] G. Vas, K. Vékey. *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 233-254.
- [18] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R. M. Marcé. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 557-568.
- [19] M. de F. Alpendurada. *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 3-14.
- [20] E. Matisová, M. Medved'ová, J. Vraniaková, P. Simon. *J. Chromatogr. A* 960 (2002) 159-164.
- [21] M. Polo, M. Llompart, C. García, R. Cela. *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 63-72.

- [22] I.O.M. Chan, P.K.S. Lam, R.H.Y. Cheung, M.H.W. Lam, R.S.S. Wu. *Analyst* 130 (2005) 1524-1529.
- [23] C.C. Chou, M.R. Lee. *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 49-56.
- [24] C. Blasco, G. Font, J. Manes, Y. Pico. *Anal. Chem.* 75 (2003) 3606-3615.
- [25] J. Hernández, A. Cifuentes, F. J. García, M. A. Rodríguez. *Electrophoresis* 26 (2005) 980-989.
- [26] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223-233.
- [27] L. Cárdenes, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 87-93.
- [28] B. Janoszka, U. Błaszczyk, A. Damasiewicz-Bodzek, M. Sajewicz. *Food Chem.* 113 (2009) 1188-1196.
- [29] H.L.Lord. *J. Chromatogr. A* 1152 (1-2) (2007) 2-13.
- [30] T. Dagnac, A. Padró, R. Rubio, G. Rauret. *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 19-30.
- [31] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, M.A. Becerra, V.A. Lemos, J.M. Bosque-Sendra. *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 443-449.
- [32] J.M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros Rodríguez, M.F. Molina. *Anal. Proc.* 32 (1995) 375-377.
- [33] K. Skog, A. Solyakov, P. Arvidsson, M. Jägerstad. *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 227-233.
- [34] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 203-212.
- [35] M. Yamada, M. Miyata, Y. Kato, M. Nakamura, M. Nishijima, T. Shibata, Y. Ito. *Shokunin Eisegaku Zasshi* 34 (1993) 635-641.
- [36] C. Gertz, K. Hermann. *Lebensm. Unters. Forsch.* 177 (1983) 186-192.
- [37] J. Seo, H.-Y. Kim, B.-C. Chung, J. Hong. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 303-309.
- [38] J. Hong, H.-Y. Kim, D.-G. Kim, J. Seo, K.-J. Kim. *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 27-35.
- [39] F. Toribio L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223-233.
- [40] U. Gerbl, M. Cichna, M. Zsivkovits, S. Knsmüller, G. Sontag. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 107-113.
- [41] M.T. Galcerán, P. Pais, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 655 (1993) 101-110.
- [42] M.M.C. Van Dyck, B. Rollmann, C. Demeester. *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 377-382.
- [43] F.J. Santos, E. Barceló-Barrachina, F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán, E. Persson, K. Skog, C. Messner, M. Murkovic, U. Nabinger, A. Ristic. *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 69-78.

-
- [44] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 203-212.
- [45] C. Krach, G. Sontag. *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 77-83.
- [46] E. Bermudo, V. Ruiz-Calero, L. Puignou, M.T. Galceran. *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 83-90.
- [47] A. Peñalver, E. Pocurrull, F. Borrull and R.M. Marce. *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 79-87.
- [48] R. López, A.C. Lapeña, J. Cacho, V. Ferreira. *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 8-15.
- [49] M. Contini, M. Esti. *Food Chem.* 94 (2006) 143-150.
- [50] L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, C. Jiménez-Linares, M. Román-Ceba. *Anal. Letters* 26 (1993) 1243-1258.
- [51] V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 515-522.
- [52] L. Pensado, C. Casais, C. Mejuto, R. Cela. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 505-513.
- [53] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223-233.
- [54] J.A. Nobrega, L.C. Trevizan, G.C.L. Araujo, A.R.A. Nogueira. *Spectrochim. Acta Part B - Atomic Spectroscopy* 57 (2002) 1855-1876.
- [55] C. Montgomery. John Wiley & Sons (Ed.), New York (1991) Chapter 11.
- [56] M. Sanz-Alaejos, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso. *J. Chromatogr. B* 862 (2008) 15-42.
- [57] A. Solyakov, K. Skog, M. Jagerstad. *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1-11.

CAPÍTULO III. APLICACIÓN DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA DETERMINACIÓN DE AMINAS HETEROCÍCLICAS MEDIANTE HPLC



III.1. Introducción

III.2. Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de Aminas Heterocíclicas mediante HPLC con detección Vis-UV y Fluorescente

III.3. Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de Aminas Heterocíclicas mediante HPLC con detección Electroquímica

III.4. Líquidos Iónicos como disolventes de desorción, supresores del efecto memoria y aditivos a la fase móvil en el acoplamiento SPME-HPLC con detección Fluorescente para la determinación de Aminas Heterocíclicas

III.5. Bibliografía

III.1 Introducción

III.1.1 Generalidades de los Líquidos Iónicos

Los líquidos iónicos (LIs) se pueden definir como sales orgánicas cuyo punto de fusión es inferior a 100°C. La diferencia de los LIs con las sales fundidas se encuentra en que los LIs son líquidos a temperaturas mucho menores que las sales fundidas. Realmente la mayoría de los líquidos iónicos descritos en la bibliografía son líquidos a temperatura ambiente, denominándoseles RTILs (*Room Temperature Ionic Liquids*). El aspecto de los LIs es semejante al de un líquido clásico un poco viscoso, pero formados únicamente por iones, por lo que su estructura es completamente diferente a la de otros disolventes formados por moléculas [1]. De forma general, se puede decir que los LIs están formados por un catión generalmente orgánico, voluminoso y asimétrico, que contiene un átomo de nitrógeno o fósforo, asociado a un anión generalmente inorgánico, aunque también puede ser orgánico [2]. En la Figura III.1.1 se muestran las estructuras de los cationes y aniones más frecuentes en los LIs. Las posibles combinaciones de estos cationes y aniones pueden originar un gran número de líquidos iónicos, surgiendo así el término “disolventes de diseño” y proporcionando una gran flexibilidad en la selección del mejor LI para una aplicación determinada, puesto que la elección de los iones determina las propiedades fisicoquímicas de los LIs.

El primer líquido iónico fue descubierto fortuitamente en 1914 mientras se buscaban nuevos explosivos durante la primera Guerra Mundial. Se trataba del nitrato de etilamonio, cuyo punto de fusión es de 12°C [3]. A partir de los años ochenta, Seddon *et al.* [1] comenzaron a utilizar los LIs como disolventes polares no acuosos. A partir de este momento el interés por los LIs ha ido en aumento [4-8] y se han sintetizado cientos de ellos.

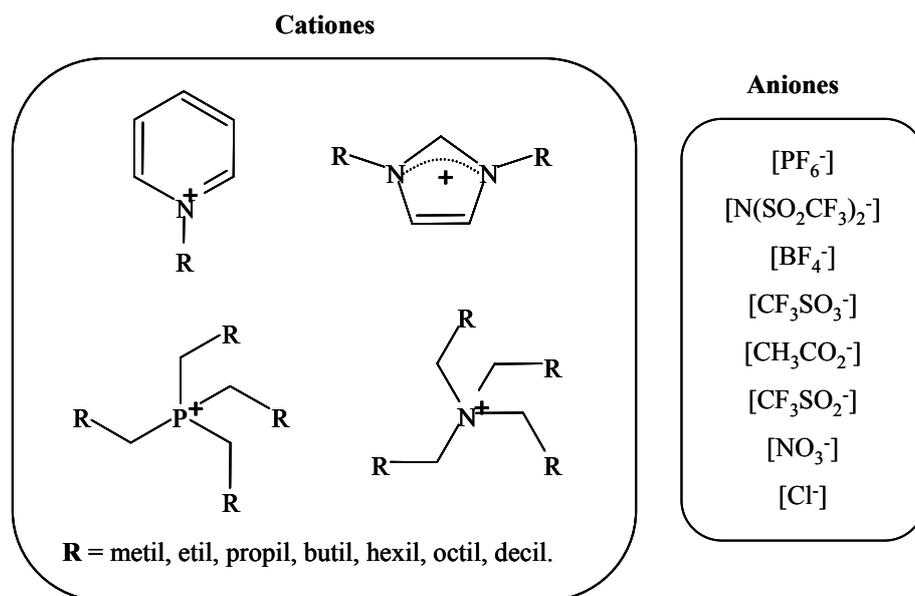


Figura III.1.1. Estructura de los cationes y aniones más comunes en los LIs.

Entre las propiedades fisicoquímicas de los LIs, descritas ampliamente en el siguiente apartado, destacan: (a) sus bajas presiones de vapor, por lo que se les considera disolventes no volátiles; (b) en una atmósfera inerte, permanecen en estado líquido en un amplio intervalo de temperaturas; (c) poseen una amplia estabilidad electroquímica, una movilidad iónica elevada y una estabilidad química importante. Estas características son la base del gran interés que suscitan estos compuestos en la “química verde” para sustituir a los disolventes orgánicos volátiles [2]. No obstante, recientemente se ha demostrado que los LIs poseen un cierto nivel de toxicidad [9, 10]. Esta toxicidad se debe a que los precursores utilizados en la síntesis de los LIs pueden ser, por ejemplo, corrosivos (1-metilimidazol), dañinos (dicianamida sódica) o tóxicos (Li[Tf₂N]). Por lo tanto, no es posible asumir que estas características de los precursores desaparecerán en el producto final. Por otra parte, Wasserscheid *et al.* [11] destacan que los LIs que contienen cationes halogenados con poca estabilidad en agua, podrían dar lugar a especies corrosivas y tóxicas, como HCl o HF.

III.1.2 Propiedades fisicoquímicas de los LIs

Las propiedades fisicoquímicas de los LIs dependen de la naturaleza y tamaño del anión y del catión que los constituyen, algunas de las cuales se describen a continuación.

Punto de fusión. Los LIs están fundidos a temperatura ambiente e incluso algunos de ellos son líquidos a temperaturas inferiores a -80°C . El principal factor que influye en el punto de fusión de los LIs es la distribución de carga sobre los iones, la capacidad de formar enlaces mediante puentes de hidrógeno, la simetría de los iones y las interacciones de Van der Waals. Comparando estos puntos de fusión tan bajos con los de las sales inorgánicas (por ejemplo, NaCl tiene un punto de fusión de 803°C), algunos autores [12] proponen que, en gran medida, la reducción de la temperatura de fusión se debe a la sustitución de los pequeños cationes inorgánicos por cationes orgánicos voluminosos y asimétricos.

Densidad. La densidad es una de las propiedades de los LIs más conocida y medida, ya que prácticamente todas las aplicaciones de los LIs requieren del conocimiento de esta propiedad. La mayoría de los LIs conocidos son más densos que el agua, con unas densidades comprendidas entre 1 y 1.6 g cm^{-3} [12]. Estos valores dependen de la masa molar del anión, que afecta significativamente a la densidad total del líquido iónico [13].

Viscosidad. La elevada viscosidad de los LIs es otra de sus propiedades fisicoquímicas características. La mayoría de los LIs son más viscosos que el agua, con viscosidades 2 o 3 órdenes de magnitud superiores a las de los disolventes orgánicos convencionales. No obstante, los LIs presentan un amplio rango de viscosidad, comprendido entre 35 y 500 cP [14]. En la actualidad no existen datos suficientes sobre la viscosidad de los LIs puros para realizar conclusiones definitivas sobre la alta viscosidad que presentan [12].

Polaridad y solubilidad. La polaridad de los líquidos iónicos ha sido evaluada utilizando la escala solvatocrómica de Reichardt (E_{T}^{N}), en la cual al agua se le asigna un valor de 100 [15]. La mayoría de los LIs presenta un valor de E_{T}^{N} comprendido entre 64-68 [16]. A modo de comparación, el valor de E_{T}^{N} para disolventes como tolueno, acetona, acetonitrilo, etanol y metanol es 10, 36, 46, 65 y 76, respectivamente [17]. La polaridad de un disolvente y su solubilidad están estrechamente relacionadas, y se ha encontrado que muchos de los LIs presentan una polaridad cercana a la del etanol [18]. Los LIs con aniones nitrato y/o tiocianato presentan una polaridad superior, incluso cercana a la del agua [19].

Por otra parte, la solubilidad de los líquidos iónicos en agua depende en gran medida de la naturaleza del anión. Los LIs que contienen aniones cloruro, bromuro o trifluoroacetato son muy solubles en agua. El mismo catión asociado a un anión como hexafluorofosfato o bis-(trifluorometilsulfonil) amiduro tiene una solubilidad limitada en agua, formando fácilmente dos fases líquidas [1].

Presión de vapor. Los LIs se caracterizan por poseer presiones de vapor prácticamente despreciables a temperatura ambiente, y en la mayoría de los casos estos valores no se pueden medir. Esta característica les confiere a los LIs la propiedad de no ser inflamables, por lo que podrían ser candidatos a sustituir a los disolventes orgánicos contaminantes [1, 20]. Esta es la principal razón por la que los LIs fueron considerados rápidamente como disolventes verdes cuando todavía no existían estudios completos sobre su toxicidad, pero, sin embargo, estudios actuales muestran indicios sobre la significativa ecotoxicidad que presentan muchos LIs [10].

Estabilidad térmica. Una de las propiedades más atractivas de los LIs es su estabilidad térmica. Los LIs presentan un amplio rango de temperaturas en las cuales no se observa una presión de vapor aparente. Algunos estudios han demostrado que las temperaturas de descomposición de los LIs son generalmente superiores a 400°C, presentando una presión de vapor mínima por debajo de estas temperaturas [13].

En la actualidad ya se conocen algunos aspectos estructurales de los LIs que podrían estar relacionados con su estabilidad térmica: en general, aquellos LIs con aniones menos nucleofílicos presentan una mayor estabilidad térmica [21]. Por otra parte, la naturaleza de la parte catiónica de los LIs ejerce una gran influencia en su estabilidad térmica [22]. Así, los LIs de la familia del amonio siempre presentan una estabilidad térmica más baja que, por ejemplo, los LIs de la familia del imidazolio, debido a que son más susceptibles de ser descompuestos a elevadas temperaturas.

Tensión superficial. En general, los valores de tensión superficial líquido/aire para los LIs son ligeramente superiores a los que presentan los disolventes convencionales. Estos valores están comprendidos entre 3.3×10^{-4} y 5.7×10^{-4} N cm⁻¹ [13], aunque no son tan altos como para el agua, abarcan un rango inusualmente amplio. Los valores de tensión superficial varían con la temperatura y tanto la entropía como la energía de exceso superficial resultan afectadas por la longitud de la cadena alquílica, disminuyendo al aumentar dicha cadena.

En la Tabla III.1.1 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los tres líquidos iónicos de la familia del 1-alkil-3-metilimidazolio que se estudian en este Capítulo, cuyas estructuras se muestran en la Figura III.1.2.

Tabla III.1.1. Propiedades fisicoquímicas de los LIs estudiados

	BMIm-BF₄	HMIm-BF₄	MOIm-BF₄
Pto. Fus. (°C)	-81	-81	-79
P.M. (Dalton)	219	253.8	281.8
ρ (25°C) (g mL⁻¹)	1.12	1.21	1.11
Viscosidad (25°C) (cP)	219	310	440
Solubilidad en agua	Soluble	Parcial	Parcial
Conductividad (mS cm⁻¹)	1.7	-	-
E_T^N	0.67	-	0.54
Temp. límite (°C)	403	-	-
Referencias	[23, 24, 25, 26]	[25, 19]	[19]

BMIm-BF₄ = 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato

HMIm-BF₄ = 1-hexil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato

MOIm-BF₄ = 1-metil-3-octilimidazolio tetrafluoroborato

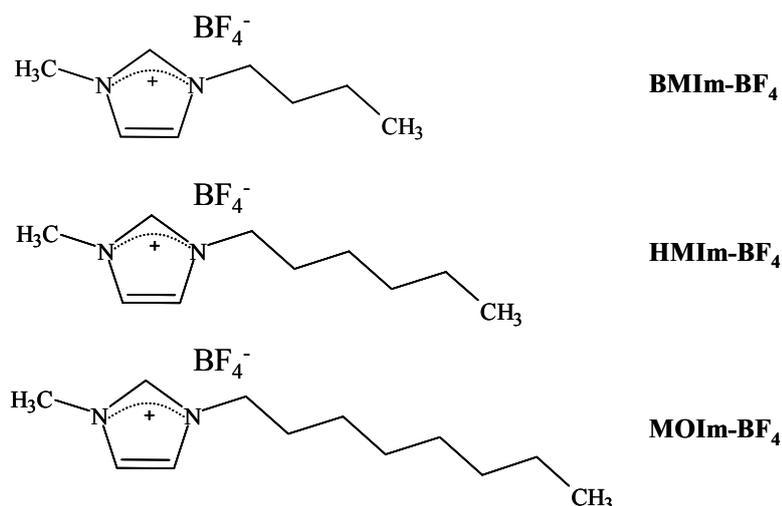


Figura III.1.2. Estructuras de los LIs de la familia del alquilimidazolio incluidos en este estudio.

III.1.3 Aplicaciones generales de los LIs

Los LIs pueden diseñarse para cada tipo de aplicación debido a que la selección de sus iones determina sus propiedades físicas y químicas. La combinación “ilimitada” de cationes y aniones deja la puerta abierta a nuevas aplicaciones de estos compuestos. En la Figura III.1.3 se muestra un esquema de las principales aplicaciones de los LIs.

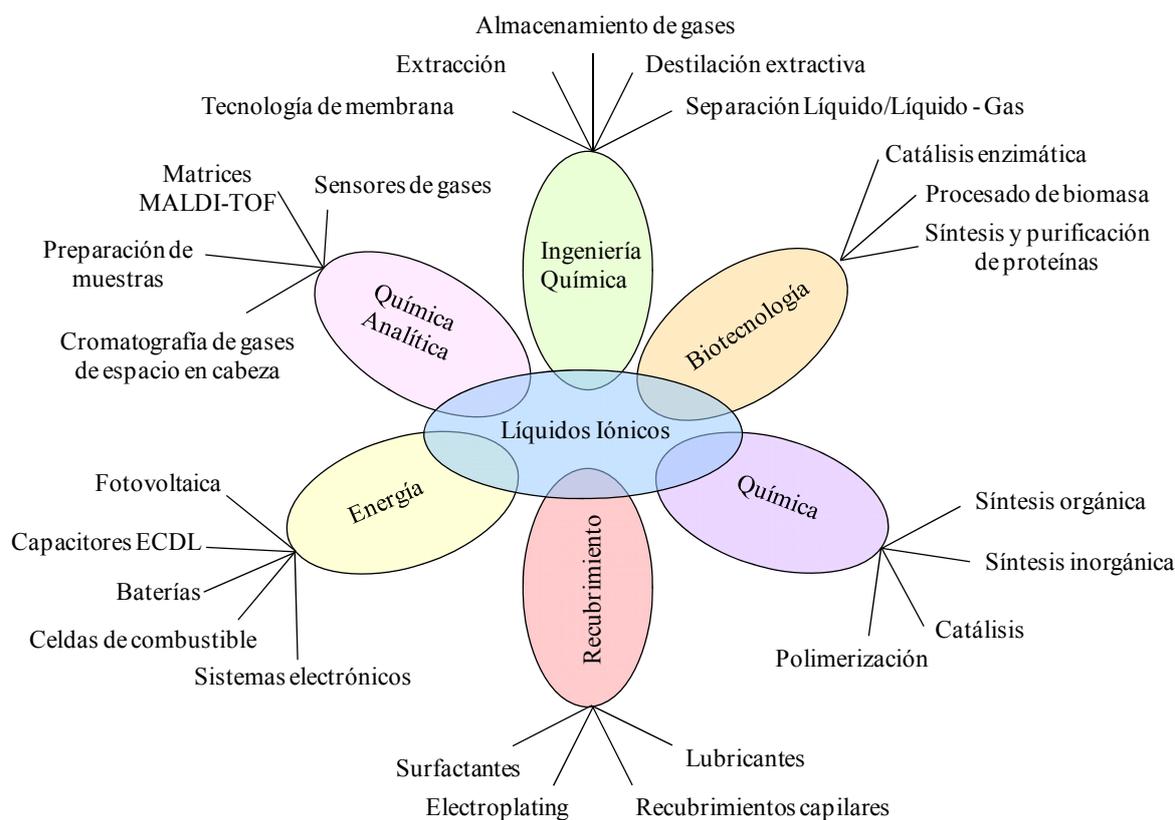


Figura III.1.3. Principales aplicaciones de los líquidos iónicos.

Los primeros LIs fueron sintetizados con fines electroquímicos, para ser utilizados como electrolitos libres de agua a baja temperatura [27]. Comparados con los electrolitos que se emplean normalmente, los LIs poseen potenciales electroquímicos y conductividades iónicas similares, a la vez que presentan un amplio intervalo de estabilidad electroquímica, son más seguros y menos tóxicos e inflamables. Estas propiedades hacen que su presencia en las diferentes ramas de la electroquímica esté cada vez más consolidada [28-30], empleándose como electrolitos en síntesis electroquímica, disolventes en electrodeposición de metales, baterías, supercondensadores, pilas de combustible, células solares y dispositivos basados en

polímeros conductores como sensores electroquímicos, músculos artificiales y dispositivos electrocrómicos.

El amplio rango de temperatura en el que se encuentran en estado líquido y su buena estabilidad térmica permiten que se les considere como una buena alternativa a los fluidos de intercambio de calor y lubricantes [31].

En la última década se ha constatado que estos nuevos disolventes presentan una gran utilidad como medios de reacción, tanto en procesos químicos como bioquímicos. Así, se han utilizado como disolventes en reacciones nucleofílicas [13, 32] y electrofílicas [13, 33]. También se han revelado como excelentes medios de reacción en biosíntesis [34, 35], presentando además en estos casos una gran capacidad para la estabilización enzimática en operaciones continuas [36].

Otro campo de investigación en que los LIs han encontrado recientemente aplicación es en procesos de separación y purificación [37]. Los LIs son capaces de extraer selectivamente un compuesto específico de una mezcla gaseosa o líquida [37-39]. Más recientemente los LIs han sido utilizados en membranas líquidas soportadas con propósitos de separación [40, 41].

Todos estos ejemplos ponen de manifiesto que en los últimos años se ha incrementado el interés en los LIs debido, no sólo a sus especiales características fisicoquímicas, sino también a su gran aplicabilidad. Debido a que nuestro interés en los LIs reside en sus aplicaciones en el campo de la Química Analítica, dedicaremos un apartado a dichas aplicaciones, con el fin de profundizar en aquellos aspectos relacionados con esta Tesis.

III.1.4 Aplicaciones de los LIs en Química Analítica

La Química Analítica en particular se ha visto beneficiada por el auge surgido alrededor de los LIs. En los últimos años se ha incrementado exponencialmente el número de publicaciones científicas en las cuales los LIs están relacionados con este campo [3].

Una de las primeras aplicaciones de los LIs en la Química Analítica consiste en la posibilidad de que sean capaces de sustituir a los disolventes orgánicos tradicionales, que además de ser tóxicos son una fuente importante de contaminación medioambiental. A partir de ahí, los LIs se han aplicado en numerosos campos de la Química Analítica, como la

preparación de muestras, técnicas cromatográficas y electroforéticas, tal y como se describe a continuación.

Preparación de muestras

Algunas propiedades características de los LIs descritas anteriormente (presiones de vapor despreciables, poca inflamabilidad y una buena solubilidad para compuestos orgánicos e inorgánicos) hacen que estos compuestos sean una opción interesante como disolventes en técnicas de preparación de muestra, tales como la extracción líquido-líquido (LLE), la microextracción en fase líquida (LPME) y la extracción (SPE) y microextracción en fase sólida (SPME).

Entre las técnicas de separación, la LLE es una de las más conocidas, versátiles y fáciles de utilizar. Sin embargo, la técnica tradicional emplea disolventes orgánicos convencionales volátiles, inflamables y tóxicos. Ésta es la razón por la que esta técnica no es compatible con los procesos modernos, que se encaminan a la búsqueda de técnicas respetuosas con el medio ambiente. Otro de sus inconvenientes es que los disolventes orgánicos convencionales están limitados en número y, en ocasiones, se hace difícil la elección del disolvente adecuado para una determinada aplicación.

Los LIs se presentan como sustitutos de los disolventes orgánicos en la Química en general, y en la Química Analítica en particular, debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas. Además, su alta capacidad de solvatación y su naturaleza iónica los hace ser unos buenos candidatos para resolver problemas asociados a la extracción de compuestos iónicos y zwitteriónicos de disoluciones acuosas.

En la Tabla III.1.2 se recogen algunas de las aplicaciones más recientes de los LIs en la LLE para la preparación de muestras.

Tabla III.1.2. Aplicaciones más recientes de los LIs en la preparación de muestras: Extracción líquido-líquido.

LI	Analito	Matriz	Ref.
BMIm-X X= -PO ₄ , -MeSO ₄ , -OCSO ₄ , -PF ₆	Hidrocarburos alifáticos y aromáticos	Agua de lluvia	[42]
C _n MIm-PF ₆ n= 4	Cadmio	Agua	[43]
n= 4, 6, 8	Disruptores endocrinos	Disoluciones acuosas	[44]
n= 4, 6, 8	Ácido 3-indol butírico	Guisantes	[45]
n= 8	Plomo	Agua	[46]
n= 4	Iones metálicos	Agua	[47]
n= 4, 6, 8	Iones metálicos	Agua	[48]
n= 4, 6	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Fe ³⁺	Disolución acuosa	[49]
n= 4, 6, 8	Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺		[50]
n= 6, 8	Compuestos fenólicos e iones metálicos		[51]
n= 4	Iones metálicos		[52]
C _n MIm-BF ₄ n= 6, 8	Disruptores endocrinos	Disoluciones acuosas	[44]
n= 6, 8	Ácido 3-indol butírico	Guisantes	[45]
BMIm-PF ₆	4-nonilfenol y 4-tert-octilfenol	Agua	[53]
	Ce ³⁺ , Eu ³⁺ , Y ³⁺		[54]
	Amino ácidos	Disolución acuosa	[55]
MOIm-PF ₆ BMIm-PF ₆	n-Butanol	Caldo de fermentación	[56]
[BMIm] ₃ CB	Proteínas		[57]
C ₄ TMSIm-PF ₆	Mercurio	Aguas de río y lago	[58]
	Aluminio	Concentrados de diálisis	[59]
Btmsim-PF ₆	Hemoglobina	Sangre	[60]
C _n MIm-NTf ₂ n= 2, 3, 4, 6, 8	Cesio	Disolución acuosa	[61]

Otra de las ventajas que se obtienen cuando se emplean los LIs, en lugar de los disolventes orgánicos convencionales, es que los primeros aportan un medio adecuado para realizar los análisis posteriores a la extracción. Por ejemplo, su naturaleza iónica abre un abanico de oportunidades en el caso de análisis electroquímicos directos de los extractos de las muestras, imposibles para la mayoría de los disolventes inmiscibles en agua.

Además, considerando que los LIs pueden prepararse fácilmente a partir de reactivos relativamente económicos y que sus características se ajustan mediante la combinación de los diferentes cationes y aniones, es posible preparar LIs para extracciones específicas de analitos en diferentes medios y crear nuevos sistemas de LLE. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, es fácil entender el aumento en el interés sobre la aplicación de los LIs como disolventes de extracción.

La mayoría de los trabajos, en los cuales se emplean LIs como disolventes en la LLE, se refieren a iones metálicos, tal y como puede verse en la Tabla III.1.2. El carácter hidrofóbico de algunos LIs les permite extraer compuestos con esta naturaleza en separaciones bifásicas. Estando hidratados, los cationes metálicos tienden a estar en la disolución acuosa. Por lo tanto, para extraer los iones metálicos de la fase acuosa hacia los LIs hidrofóbicos, generalmente hay que añadir extractantes (o complejantes, ligandos) con el objeto de formar complejos para incrementar la hidrofobicidad del metal [54]. La solvatación de los complejos está termodinámicamente más favorecida que con los disolventes orgánicos convencionales, siendo esta la principal ventaja del uso de los LIs para la extracción de iones metálicos.

Entre las técnicas de preconcentración y microextracción para la preparación de muestras que se han desarrollado recientemente, destacan la microextracción en fase líquida (LPME) y la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). La LPME es una técnica rápida, sencilla, económica y que emplea pequeños volúmenes de disolvente para la preparación de las muestras [62]. Esta técnica presenta eficiencias de extracción y reproducibilidades similares a las que se obtienen con la microextracción en fase sólida (SPME). La LPME puede realizarse tanto con una gota de disolvente [63] como con una pequeña porción de fibra hueca en cuyos poros se inmoviliza el disolvente [64, 65], llevándose a cabo generalmente mediante el modo de inmersión, aunque también es posible la extracción en espacio de cabeza [66]. Una vez que los analitos están retenidos en la gota o en la fibra, se analizan mediante HPLC [67] o GC [62].

La posibilidad de modificar tanto la hidrofobicidad como las propiedades fisicoquímicas de los LIs, diseñando así LIs adecuados para cada aplicación, sugiere que estas especies puedan emplearse en la LPME, tal y como se aprecia en la Tabla III.1.3. Además, su alta viscosidad así como sus presiones de vapor despreciables, les hacen ser candidatos óptimos para formar gotas estables. La primera referencia sobre esta aplicación de los LIs se debe a Jing-fu *et al.* [66], quienes demostraron que LIs como el C₈MIm-PF₆ puede utilizarse como disolvente de extracción en LPME. Desde entonces, los LIs han fomentado el interés en el desarrollo de esta técnica [67-72].

La DLLME se basa en hacer uso de una mezcla constituida por un disolvente extractante no miscible en agua (unos pocos microlitros), y un disolvente dispersor polar miscible en agua. La mezcla se añade a gran velocidad a una disolución acuosa que contiene los analitos de interés, de modo que el disolvente extractante se dispersa en la disolución acuosa, gracias al efecto del disolvente dispersor, formándose una emulsión. La fase extractante se separa posteriormente por centrifugación, y a continuación puede manipularse fácilmente con una microjeringa. Cabe resaltar que la mezcla instantánea de los tres componentes, extractante, dispersor y disolución acuosa conteniendo los analitos de interés, asegura que se alcance el equilibrio en unos pocos segundos, debido al gran espacio superficial existente entre las microgotas de extractante y la disolución acuosa. Es por ello que esta técnica se caracteriza por tiempos de extracción muy cortos, especialmente si se comparan con los tiempos necesarios en otras técnicas microextractivas, como la microextracción en fase sólida o la microextracción en fase líquida. En la Tabla II.1.3 se recogen algunas aplicaciones de los LIs como disolventes extractantes en DLLME.

Recientemente se ha descrito un nuevo grupo de LIs capaces de formar agregados en disolución acuosa [73-76]. Este comportamiento hace posible incluirles en la categoría de compuestos capaces de formar medios organizados, como los surfactantes. La utilización de estos agregados en procedimientos de extracción de compuestos hidrofóbicos, que se encuentran en matrices sólidas, presenta ventajas medioambientales frente a los disolventes orgánicos convencionales y pueden considerarse mejores extractantes que los surfactantes catiónicos [77]. En la Tabla III.1.4 se recogen algunas aplicaciones de extracción asistida por microondas con LIs o agregados de LIs.

Tabla III.1.3. Aplicaciones más recientes de los LIs en la preparación de muestras: Microextracción en fase líquida (LPME).

LI	Analito	Matriz	Ref.	
LPME				
C ₄ MIm-PF ₆	Níquel	Agua, té negro	[78]	
	Diclorodifeniltricloroetano y sus metabolitos	Agua	[68]	
	Clorobenceno	Agua	[69]	
	Fenoles	Agua	[70]	
	Diclorodifeniltricloroetano y sus metabolitos	Agua	[68]	
	Anilinas clorinadas	Agua	[71]	
	Diclorometano, p-xileno y n-undecano	Agua	[72]	
	Plomo	Agua y alimentos	[79]	
	Manganeso	Agua	[80]	
	Cobre, mercurio y plomo	Muestras biológicas y ambientales	[81]	
C ₆ MIm-PF ₆	Clorobencenos	Agua	[82]	
	Alquilfenoles	Muestras acuosas	[67]	
	4-nonilfenol y 4-tert-octilfenol	Agua	[67]	
	Benzofenona-3	Orina	[83]	
C ₈ MIm-PF ₆	HAPs	Agua	[66]	
HMIm-BF ₄ C ₄ MIm-PF ₆	Mercurio	Agua	[84]	
MOIm-PF ₆ BMIm-PF ₆	Isómeros de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX)	Agua	[85]	
LPME-dispersiva				
HMIm-PF ₆	Cadmio	Agua	[86]	
C _n Mim-PF ₆	n= 4, 6, 8	HAPs	Agua	[87]
	n= 6	Pesticidas organofosforados	Muestras ambientales	[88]
	n= 6	Insecticidas	Agua	[89]
	n= 4, 6	Pesticidas	Plátanos	[90]
HPy-PF ₆	Zinc	Agua y leche	[91]	

Tabla III.1.4. Aplicaciones más recientes de los LIs en la preparación de muestras: Extracción asistida por microondas, microextracción en fase sólida (SPME), extracción en fase sólida (SPE) y microextracción mediante agregados inducidos por congelación (CIAME).

LI	Analito	Matriz	Ref.
Extracción asistida por microondas			
BMIm-X X= Cl, Br, BF ₄ , N(CN ₂), H ₂ SO ₄	Compuestos fenólicos	Plantas medicinales	[92]
EMIm-Br HMIm-Br (BMIm) ₂ SO ₄			
[HDMIm]Br	HAPs	Sedimentos	[93]
BMIm-X X= Cl, Br, BF ₄	Trans-reverastrol	Plantas	[94]
SPME			
C ₈ MIm-TfO	PAHs	Agua	[95]
C _n MIm-PF ₆ C _n MIm-BF ₄	Acetona	Plasma humano	[96]
BMIm-PF ₆ MOIm-PF ₆	PAHs	Incienso anti-mosquitos	[97]
C ₈ MImPF ₆	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno	Pintura	[98]
ViDDIm-NTf ₂ ViHIm-NTf ₂	Ésteres	Vino sintético	[99]
ViDDIm-NTf ₂ ViHIm-NTf ₂ ViHDIIm-NTf ₂	Metanfetamina y anfetamina	Orina	[100]
SPE			
C ₁₂ MIm-Br	Ftalatos	Agua	[101]
CIAME			
HMIm-PF ₆ HMIm-Tf ₂ N	Mercurio	Agua	[102]
HMIm-PF ₆ HMIm-Tf ₂ N	Cobalto	Agua	[103]

Otra de las aplicaciones más recientes y novedosas de los LIs es que estas sustancias pueden absorberse físicamente sobre fibras de SPME. Una de las primeras referencias bibliográficas que se encuentran sobre el recubrimiento de fibras SPME por LIs fue desarrollada por Liu *et al.* [98]. El método se aplicó a la determinación de BTEX en pinturas, utilizando el LI C₈MIM-PF₆ para recubrir la fibra de SPME.

Inicialmente, los LIs se usaron como recubrimientos desechables (no reutilizables) [98]. Posteriormente, los LIs se depositaron sobre membranas “nafion” [95]. En ambos casos, las fibras necesitaron ser recubiertas de LI tras cada etapa de desorción. Recientemente, los LIs se han usado tras impregnar un elastómero de silicona con enlaces cruzados, y en este caso, sí pudieron emplearse como fibras reutilizables en SPME [100]. Anderson *et al.* fueron los primeros en mostrar que los polímeros de LIs (PILs, *Polymeric Ionic Liquids*) exhibían una serie de propiedades materiales únicas, al tiempo que mantenían en gran medida las propiedades de solvatación inherentes a los LIs [99, 104]. La estabilidad de los recubrimientos absorbentes basados en los PILs (en términos de estabilidad de la capa de recubrimiento y de estabilidad térmica) ha permitido el desarrollo de recubrimientos reutilizables para SPME en espacio en cabeza. Además, la posibilidad de modificar el monómero del PIL permite la incorporación de grupos funcionales en la estructura del polímero, lo que ha conducido a la producción de recubrimientos absorbentes capaces de una extracción selectiva de analitos, tales como CO₂ [105].

Por último, mencionar dos aplicaciones de los LIs en las técnicas de separación analítica y preparación de las muestras que, aunque de gran interés, no se han desarrollado tanto como las mencionadas anteriormente: LIs en membranas líquidas [106], su retención en materiales absorbentes para extracción en fase sólida [107] y la microextracción mediante agregados inducidos por congelación (CIAME).

En la Tabla III.1.4 se recogen las aplicaciones más recientes de los LIs en la preparación de muestras mediante las técnicas mencionadas anteriormente.

Técnicas cromatográficas y electroforéticas

La aplicación más extendida de los LIs en el campo de la Química Analítica es en el área de las separaciones analíticas mediante técnicas cromatográficas. En la Figura III.1.4 se muestra un diagrama en el que se representan las mejoras en la selectividad de las técnicas cromatográficas y electroforéticas cuando se emplean LIs.

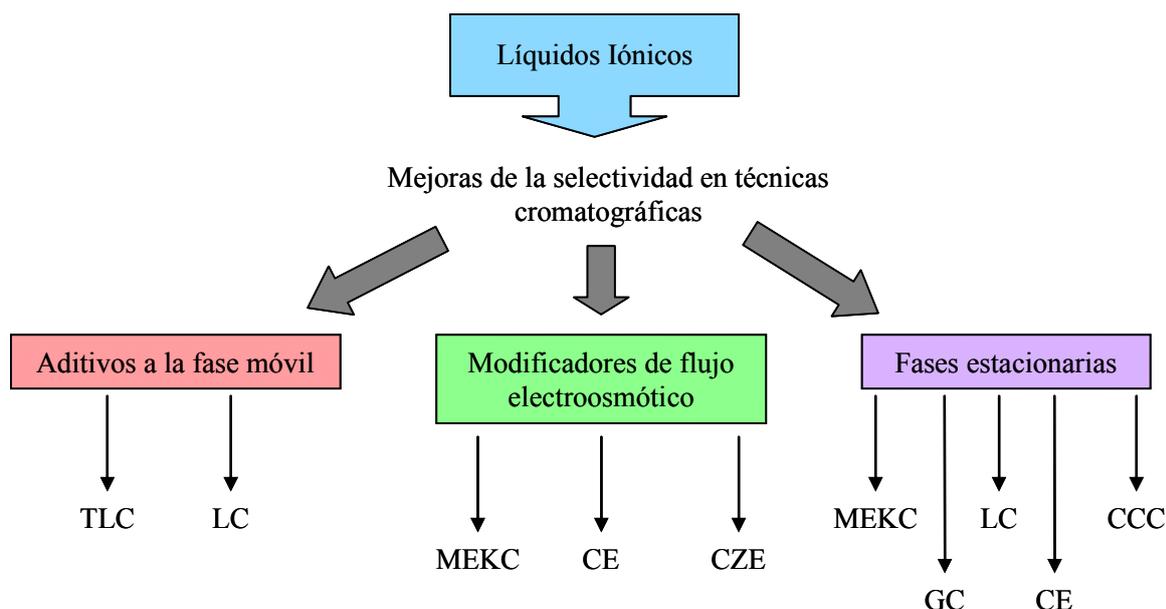


Figura III.1.4. Mejoras de la selectividad en las técnicas cromatográficas cuando se emplean LIs.

TLC: Cromatografía en capa fina; MEKC: Cromatografía electrocinética capilar micelar, CZE: Electroforesis capilar de zona, CCC: Cromatografía en contra corriente.

(a) Cromatografía de gases

Muchos autores [3, 19, 24, 106, 108-110] coinciden en que debido a sus propiedades características, los LIs pueden ser candidatos adecuados para recubrir fases estacionarias en la GC, especialmente los LIs de las familias del imidazolio y pirrolidinio.

Los LIs pueden emplearse como fases estacionarias para GC tanto en columnas empaquetadas como en columnas capilares. Las primeras referencias sobre las fases estacionarias modificadas con LIs se deben a Poole *et al.* [111, 112], quienes demostraron que

estas fases estacionarias poseían unas características de retención únicas comparadas con otras fases estacionarias no iónicas.

A partir de estos primeros trabajos, se puso de manifiesto la naturaleza dual que presentaban los LIs al emplearse en las fases estacionarias: estas fases son capaces de retener y separar compuestos tanto polares como no polares [110, 113].

Sin embargo, a pesar de que los LIs presentaban algunas características esenciales para actuar como buenas fases estacionarias en GC [114-116] (alta viscosidad, alta estabilidad térmica y despreciable presión de vapor, entre otras), algunos solutos quedaban fuertemente retenidos, con factores de simetría de pico relativamente grandes, pobres eficacias de pico o, simplemente, no se eluían. Además, los LIs mostraban sangrado en las columnas a temperaturas más bajas que las fases estacionarias convencionales, posiblemente debido a una descomposición térmica parcial o a una ligera volatilización [113, 114]. Para solucionar estos inconvenientes, Armstrong y Anderson [114] han diseñado nuevos LIs que han dado lugar a fases estacionarias adecuadas para la separación de alcanos lineales y compuestos isoméricos. En los últimos años, estos autores han estudiado los efectos beneficiosos de las fases estacionarias recubiertas de LIs para la GC [117-120].

Para incrementar el rango de temperatura en el cual los LIs estén en estado líquido y su estabilidad térmica, se han desarrollado los LIs dicatiónicos [121]. Estos LIs dicatiónicos, que presentan propiedades de solvatación similares a las de los LIs monocatiónicos, exhiben estabilidades térmicas que se encuentran sobre 350°C. Se ha demostrado que empleando estos LIs, como fases estacionarias en la GC, los rangos de las temperaturas de trabajo se amplían de manera importante [123]. Éste es el principal motivo por el que las primeras columnas de GC con fases estacionarias de LIs que se han comercializado, para aplicaciones que necesitan elevadas temperaturas de trabajo, emplean este tipo de LIs dicatiónicos [22].

La GC es una de las primeras técnicas de separación en la cual los LIs se utilizan en separaciones de compuestos quirales. La aplicación de los LIs se puede hacer de dos formas: disolviendo un selector quiral en un LI no quiral o el LI puede ser quiral por sí mismo [123].

Por otra parte, la GC de fase inversa es un buen método para estudiar las propiedades de los LIs, para ello se preparan columnas capilares impregnadas de los diferentes líquidos iónicos que se quieren estudiar [3]. Observando las variaciones de la retención de solutos de diversa polaridad, en diferentes columnas y a varias temperaturas, se pueden deducir propiedades fisicoquímicas de los LIs [124-127].

(b) Cromatografía líquida

En la cromatografía líquida, los LIs pueden participar en dos aspectos: en primer lugar, estas sustancias pueden emplearse en la fase móvil, tanto como modificadores orgánicos como aditivos a la fase móvil para suprimir el efecto de los grupos silanol residuales y, por otra parte, recubriendo las fases estacionarias.

Cuando los LIs se emplean como modificadores orgánicos la principal desventaja que presentan es su elevada viscosidad, comparada con la de los modificadores orgánicos convencionales (metanol y acetonitrilo). La primera referencia sobre esta aplicación de los LIs se debe a Poole *et al.* [128], quienes separaron algunos compuestos aromáticos empleando LIs como modificadores orgánicos. Pero incluso trabajando a velocidades de flujo de 0.05 mL min^{-1} , las presiones generadas eran demasiado altas.

Por otra parte, varios autores [129, 130] han demostrado que los LIs de la familia del alquilamonio son peores modificadores que el metanol o el acetonitrilo, debido principalmente a su elevada viscosidad, menor transparencia en detección Vis-UV y a que dan lugar a eficacias de pico inferiores. En la actualidad, no se ha encontrado ningún LI capaz de sustituir a los modificadores orgánicos convencionales, como el metanol y el acetonitrilo.

La otra alternativa para emplear los LIs en la fase móvil utilizada en la cromatografía líquida es su uso como aditivos de la misma debido, principalmente, a su efecto supresor de los grupos silanol. Esta aplicación se desarrollará en el siguiente apartado, III.1.5, ya que parece de interés profundizar en este aspecto de los LIs, que posteriormente se usará para la separación cromatográfica de las aminas heterocíclicas.

Considerando el efecto que tienen los LIs cuando se añaden a la fase móvil, tanto como modificadores orgánicos como aditivos a la fase móvil, algunos autores consideraron interesante desarrollar fases estacionarias con LIs. Una de las primeras referencias, que se encuentra en la bibliografía, sobre las fases estacionarias con LIs se debe a Jiang *et al.* [131]. Los resultados obtenidos no fueron tan buenos como cuando se empleaban los LIs como aditivos a la fase móvil con columnas comerciales.

Posteriormente se han desarrollado fases estacionarias basadas en los LIs PMIm-Br y BMIm-Br para la separación de un grupo de ácidos orgánicos [132]. Una de las principales ventajas encontradas a la hora de utilizar estas fases estacionarias es que la separación cromatográfica se realiza en fase acuosa con pequeños volúmenes de disolventes orgánicos

(aproximadamente el 1%). Estos resultados deben servir para impulsar el desarrollo de estas fases estacionarias con el fin de suprimir el uso de los disolventes orgánicos en la separación cromatográfica.

(c) Electroforesis capilar

A pesar de que los LIs posean unas características excepcionales como disolventes, no pueden emplearse directamente como disolventes en electroforesis capilar (CE). Esto se debe principalmente a que son sales viscosas y conductoras, y la corriente producida podría ser alta y, además, el voltaje aplicado, así como el campo eléctrico, podrían ser bajos [19]. Por el contrario, los LIs se pueden emplear como recubrimiento de las paredes de los capilares, como en la GC, aunque existen pocos trabajos sobre esta aplicación. En general, la principal aplicación de los LIs en la electroforesis capilar es su uso como electrolitos de transporte en disoluciones acuosas o en disolventes orgánicos polares (electroforesis capilar no acuosa) [129, 130, 133].

El carácter hidrofóbico de la parte catiónica es la responsable de su adsorción en las paredes del capilar. De esta manera, los cationes inmovilizados producen un cambio del flujo electroosmótico, que puede emplearse en separaciones de mezclas de analitos. Debido a que la hidrofobicidad del catión del LI depende en gran medida de la longitud de su cadena alquílica, el recubrimiento puede ajustarse modificando la naturaleza del catión del LI o su concentración [134-137].

III.1.5 Reducción de las interacciones silanofílicas en HPLC con el uso de los LIs

Por sus características físicas y su versatilidad, la sílice es el soporte más ampliamente utilizado para fases estacionarias en cromatografía líquida en fase inversa (RPLC). La alta versatilidad de los empaquetamientos de sílice es debida a la facilidad para enlazar diferentes fases estacionarias a las partículas silíceas, consiguiendo así un amplio rango de selectividades.

Sin embargo, los materiales basados en la sílice presentan algunas desventajas para el análisis de compuestos básicos debido a la fuerte interacción entre estos compuestos y el soporte de la fase estacionaria. La posición al azar de los enlaces generados entre la fase

estacionaria y el soporte, conjuntamente con el impedimento estérico, favorece la presencia de silanoles residuales libres en la superficie de la fase estacionaria. Así, la interacción de analitos básicos con estos grupos silanol residuales se considera la causa de la asimetría de los picos, bajas eficacia, pobre reproducibilidad y altos tiempos de retención que se observan con frecuencia en la elución cromatográfica de compuestos básicos [138].

Estas interacciones silanofílicas pueden suprimirse de varias maneras: incrementando el contenido en agua en la fase móvil, trabajando a pH bajos y añadiendo una sustancia capaz de interactuar con los grupos silanol residuales compitiendo con las moléculas del soluto [138]. Sin embargo, no siempre es posible aumentar el porcentaje de la fase acuosa en la composición de la fase móvil, ya que en la mayoría de los casos se produce un gran aumento de los tiempos de retención de los compuestos básicos, o incluso trabajar a valores de pH lo suficientemente bajos. Parece lógico pensar que la presencia de un aditivo en la fase móvil, capaz de interactuar con los grupos silanol residuales de la fase estacionaria, es la solución más conveniente en la mayoría de las determinaciones de compuestos básicos mediante la cromatografía líquida. Las aminas terciarias son un ejemplo de este tipo de agentes supresores, ya que son capaces de interactuar con los grupos silanol que se encuentran sobre la superficie de la fase estacionaria, favoreciendo la elución de los analitos básicos. La trietilamina (TEA) es uno de los compuestos que más frecuentemente se utiliza como supresor de los grupos silanol residuales [139-144], pero su presencia en la fase móvil puede provocar que el sistema cromatográfico se equilibre más lentamente [145]. También se han empleado con éxito otras aminas terciarias como la ciclohexilamina y la dimetiloctilamina [146-148]. Debido a las ventajas prácticas que presenta la adición de estos agentes supresores a la fase móvil, se ha producido un continuo interés en la búsqueda de nuevos aditivos.

Recientemente, y debido a sus propiedades características, se han propuesto los LIs como posibles agentes supresores de la actividad de los grupos silanol en las fases estacionarias silíceas [149-151]. Jiang *et al.* estudiaron los efectos en la separación de efedrinas [150] y catecolaminas [151] cuando se añade a la fase acuosa un LI como agente supresor de los grupos silanol. Los resultados obtenidos indican que la adición de pequeñas cantidades (2-50 mM) de LI en la fase móvil acuosa mejora la forma de los picos de los analitos. A partir de ese momento, se ha incrementado el interés en el estudio de la viabilidad de algunos LIs que podrían actuar como supresores de los grupos silanol residuales [149, 151-]

154]. Así, Kaliszan *et al.* confirmaron una mejora significativa en la forma de los picos de analitos básicos añadiendo pequeñas cantidades de LIs a las fases móviles [152, 155].

Cuando los LIs se añaden como aditivos a la fase móvil, incluso en pequeñas cantidades, se comportan como sales, es decir, sus propiedades como LIs se pierden o disminuyen. Como sales, los LIs presentan una doble naturaleza que debe tenerse en cuenta: los LIs están compuestos de cationes y de aniones, y ambas especies pueden influir en los resultados cromatográficos.

Se ha demostrado que los aniones pueden adsorberse en la fase estacionaria hidrofóbica en cantidades que depende de la serie de Hofmeister [19, 25]:



De la misma manera, los cationes de los LIs también pueden adsorberse en las fases estacionarias C₁₈ siguiendo series electrónicas relacionadas directamente con la longitud de la cadena alquílica [19].

La mayoría de los compuestos básicos poseen grupos amino que pueden cargarse positivamente en presencia de fases móviles con bajos valores de pH. La retención de estos compuestos depende de la combinación entre las interacciones eléctricas (carga-carga) e hidrofóbicas, que se producen entre la fase estacionaria y los iones presentes en la fase móvil [19]. En fases móviles acuosas, las interacciones carga-carga normalmente son más fuertes y más lentas que las interacciones hidrofóbicas. En la Tabla III.1.5 se muestran los posibles efectos de las interacciones de los aniones y cationes de los LIs tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria, y los efectos producidos sobre los cromatogramas.

Tabla III.1.5. Interacciones entre los aniones y cationes de los LIs en la separación de compuestos básicos (cargados positivamente) mediante cromatografía líquida.

	Interacción	Efecto sobre el cromatograma
	Pares iónicos con los solutos cargados positivamente	
Anión	Fase móvil Disminución de las interacciones electroestáticas	Mejora la forma de los picos de los solutos
	Incremento de la interacción hidrofóbica	Mayor factor de retención de los solutos
	Fase estacionaria Incremento de las interacciones de intercambio iónico con el soluto catiónico	Mayor factor de retención de los solutos y un pequeño efecto sobre las formas de los picos
	Repulsión con los solutos cargados positivamente	
Catión	Fase móvil Puede interaccionar con los aniones disociados del soluto	
	Fase estacionaria La adsorción del catión disminuye las interacciones carga-carga con el soluto catiónico	Menor factor de retención del soluto y mejoras en las formas de los picos

Los LIs de las familias del 1-alkil-3-metilimidazolio y del N-piridinio han resultado ser supresores efectivos de los grupos silanol residuales cuando se añaden a la fase móvil en la separación de catecolaminas [156]. Los cromatogramas obtenidos cuando se emplean los LIs como aditivos a la fase móvil muestran, de forma general, picos más simétricos y tiempos de análisis más cortos. Esto es debido a que el catión del LI no sólo interacciona con los grupos silanol residuales de la fase estacionaria, mejorando los factores de asimetría de los picos, sino que también se adsorbe sobre las cadenas C₁₈, lo que da lugar a una disminución en la retención de los analitos. En la Figura III.1.5 se muestra un esquema sobre las interacciones de los LIs de la familia del alquilimidazolio y los grupos silanol residuales que se encuentran presentes en la superficie de las fases estacionarias.

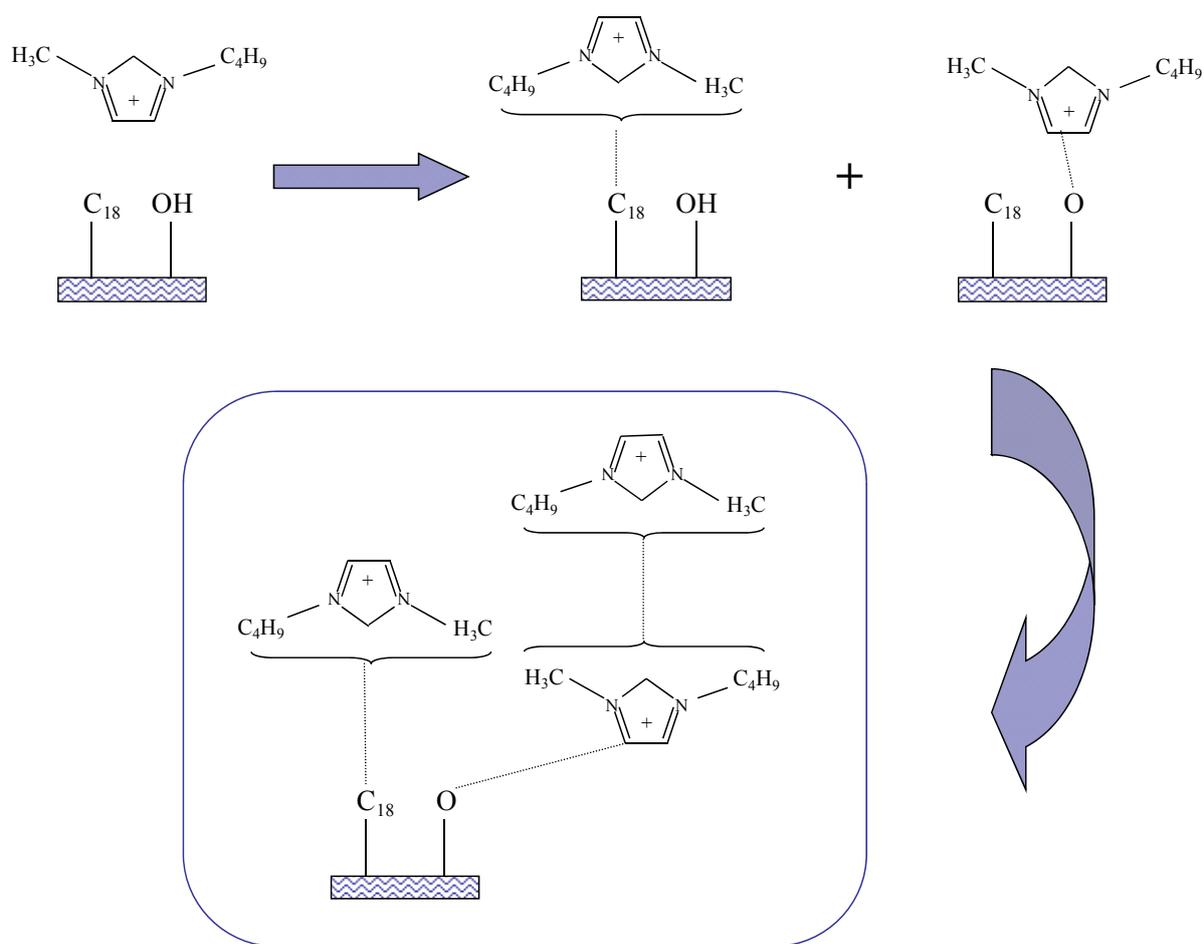


Figura III.1.5. Esquema de las interacciones de los LIs de la familia del alquilimidazolio con los grupos silanol residuales de las fases estacionarias C₁₈.

Esta supresión de los efectos de los grupos silanol residuales puede alcanzarse incluso con pequeñas concentraciones de LIs en la fase móvil, especialmente los de la familia del imidazolio tetrafluoroborato (0.5-1.5%). Esta clase de LIs presenta un excelente comportamiento como supresores cuando se añaden a la fase móvil, siendo superiores incluso que los aditivos que se emplean normalmente con este mismo fin [157]. De esta manera el 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato ha sido comparado con la trietilamina (TEA) como un aditivo de la fase móvil bloqueador de los grupos silanol en la separación de β -bloqueantes [132]. La presencia de este LI mejoró de manera significativa los factores de asimetría de los picos con respecto a la TEA.

III.1.6 Objeto del trabajo

El objetivo principal del presente Capítulo se ha centrado en la aplicación de un grupo de LIs de la familia del alquilmetilimidazolio a la determinación de AHs mediante HPLC. Atendiendo a las propiedades características de los LIs, la atención se centrará en su uso como aditivos a la fase móvil, aprovechando sus propiedades como agente supresor de los grupos silanol de las fases estacionarias silíceas. Además, sus propiedades solubilizantes permitirán su uso como disolventes de elución en la extracción en fase sólida de AHs, así como disolventes de desorción y supresores del efecto memoria en SPME-HPLC.

En el Capítulo II se han desarrollado metodologías de HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica para la determinación de AHs, a pesar de que los resultados obtenidos son aceptables y comparables con los obtenidos por otros autores, dichas metodologías presentan una serie de inconvenientes tales como, picos cromatográficos asimétricos, bajas eficacias y elevados tiempos de retención, lo que dificulta su determinación cromatográfica. Para solucionar estos efectos negativos, y debido a las propiedades bloqueantes de los grupos silanol residuales que presentan los LIs, se ha fijado, como primer objetivo parcial de este capítulo, estudiar el efecto de LIs como aditivos a la fase móvil en la determinación de AHs por HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica. Básicamente, para alcanzar este objetivo, la atención se centrará en:

- Estudiar las características ópticas y electroquímicas de los LIs utilizados, así como de las AHs en presencia de dichos LIs.
- Estudiar el efecto de los LIs como aditivos a la fase móvil en el comportamiento cromatográfico de las AHs, usando distintas fases estacionarias y detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica; y comparar los resultados con los obtenidos cuando se hace uso de los aditivos habitualmente empleados en la separación de las AHs.
- Evaluar el efecto enmascarante de los grupos silanol residuales por los LIs para fases estacionarias de distinta naturaleza, con objeto de determinar la combinación LI - fase estacionaria más adecuada para la determinación cromatográfica de las AHs.
- Determinar las características analíticas de los métodos cromatográficos seleccionados, cuando se emplean LIs como aditivos a la fase móvil, y establecer la aplicabilidad de dichos métodos al análisis de AHs en extractos de carne de distinta naturaleza.

Por otra parte, en el apartado II.4 se recoge la determinación de AHs por HPLC con detección electroquímica e inyección directa. Ahora bien, a pesar de los buenos resultados obtenidos, componentes de la matriz de las muestras (extractos de carne) quedaban retenidos sobre la superficie del electrodo, disminuyendo su sensibilidad. Con objeto de eliminar estas interferencias, planteamos como un objetivo parcial en este Capítulo incluir una etapa de extracción en fase sólida (SPE) como paso previo de preconcentración de las AHs y limpieza de las muestras, utilizando LIs como disolvente de elución de las mismas, lo que permitirá la inyección directa del eluato en el sistema cromatográfico sin recurrir a cambios de disolvente.

Asimismo, el acoplamiento SPME-HPLC resultó ser un método adecuado para la determinación de AHs en muestras de alimentos. Sin embargo, en SPME-HPLC el efecto memoria puede llegar a ser un problema cuando la concentración de los analitos es muy baja o la sensibilidad del detector es elevada. Atendiendo a las buenas propiedades que como disolventes presentan los LIs, en este Capítulo, se pretende también evaluar el LI BMIm-BF₄ como disolvente de desorción y supresor del efecto memoria en SPME-HPLC con detección fluorescente. Con tal fin, se estudiarán y optimizarán algunos parámetros relacionados con el paso de la desorción en SPME, incluyendo la composición del disolvente y tiempo de desorción, la composición del disolvente de lavado y el número de lavados, tanto de la fibra como de la cámara de desorción, necesarios para eliminar el efecto memoria. Finalmente, para evaluar la aplicabilidad del método se realizará un estudio de recuperaciones en muestras de extractos de carne enriquecidos.

III.2 Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de AHs mediante HPLC con detección Vis-UV y Fluorescente

El análisis cromatográfico de las AHs es, en general, problemático debido a las interacciones de intercambio iónico que tienen lugar entre las especies protonadas con carga positiva y los grupos silanol residuales ionizados sobre la superficie de las fases convencionales de base sílice. Esto da lugar a picos asimétricos y bajas eficacias. Los silanoles residuales son la consecuencia de un recubrimiento incompleto del material empacado. Además, las impurezas metálicas en la sílice pueden aumentar notablemente la acidez de los silanoles y, por lo tanto, incrementar las interacciones indeseadas con los analitos básicos. Otro factor importante para que tengan lugar dichas interacciones es la accesibilidad de los solutos a los grupos silanol. Este hecho, junto con los métodos propuestos para mejorar el comportamiento cromatográfico de las bases, ha sido estudiado y revisado extensamente [139, 146, 148, 158-162].

Se ha conseguido una mejora considerable en el análisis de los compuestos básicos mediante RPLC con el desarrollo de sustratos de sílice alta pureza (sílice tipo B con un contenido bajo de metales) [163]. También se han desarrollado varias estrategias para disminuir el número de silanoles residuales en la superficie de la sílice. El proceso más común es la protección de la columna, que tampoco elimina completamente los silanoles. Con el fin de reducir la accesibilidad a los silanoles libres, se han desarrollado nuevos empaquetamientos con grupos diseñados especialmente para este fin (grupos voluminosos, bidentados, recubrimiento polimérico).

Recientemente se han propuesto los líquidos iónicos (LIs) como posibles agentes supresores de los grupos silanol residuales [149, 150, 164, 165]. Como se ha comentado en la Introducción a este Capítulo, la adición de pequeñas cantidades de LIs a la fase móvil da lugar a una disminución en las colas de los picos, una reducción del ancho de banda y una mejora de la resolución [152, 154, 166, 167]. Estas mejoras se atribuyen en parte a la competición entre los cationes de los LIs y los grupos polares de los analitos por los grupos silanol residuales, junto con la formación de una estructura en forma de bicapa electrónica débil

[108]. Asimismo, los LIs se han comparado con la TEA como aditivos a la fase móvil [164, 168], poniéndose de manifiesto que los LIs, y especialmente, los de la familia del alquilimidazolio, son supresores de los grupos silanol residuales superiores que la TEA en las fases estacionarias C₁₈.

Hasta la actualidad, la mayoría de las aplicaciones descritas en la bibliografía sobre los LIs como aditivos a la fase móvil en HPLC están relacionadas con la detección Vis-UV o de diodos [169, 153]. Sin embargo, no es frecuente encontrar referencias sobre la aplicación de los LIs con detección fluorescente. Esto puede deberse a que algunos LIs, y especialmente los de la familia del alquilimidazolio, no son transparentes a las longitudes de onda a las que normalmente se trabaja [170, 171].

El principal objetivo de este apartado consiste en estudiar los efectos de tres líquidos iónicos de la familia del alquilimidazolio (1-butil-3-metilimidazolio, 1-hexil-3-metilimidazolio y 1-metil-3-octilimidazolio tetrafluoroborato) como aditivos a la fase móvil en HPLC con detección Vis-UV y fluorescente para la determinación de AHs.

Para llevar a cabo estos estudios se han seleccionado tres fases estacionarias de distinta naturaleza. La primera de ellas, es la TSK-Gel ODS 80TM, que es la que se utiliza con más frecuencia para la separación de las AHs [172-174]. Otra es la de la columna ABZ+plus, una fase estacionaria enlazada Si-(CH₂)₃NHCO(CH₂)₁₄CH₃, que presenta la particularidad de que prácticamente todos los grupos silanol están enlazados a la cadena C₁₆, formando una barrera electrostática [175, 176]. Estas características hacen que sea una fase estacionaria adecuada para la separación cromatográfica de compuestos básicos, como es el caso de las AHs. Por último, elegimos una fase estacionaria que no es específica para la separación de las AHs, la NovaPak®. Esta última columna y la TSK-Gel ODS 80TM presentan una actividad moderada de los grupos silanol. La Tabla III.2.1 compara las propiedades fisicoquímicas de las tres columnas.

Tabla III.2.1. Propiedades fisicoquímicas de las tres columnas utilizadas

	NovaPak®	ABZ+plus	TSK-Gel ODS-80™
Longitud (mm)	15	15	15
Diámetro interno (mm)	3.9	2.1	4.6
Tamaño de partícula (µm)	4	5	5
Tamaño de poro (Å)	60	100	80
Área Superficial (m ² g ⁻¹)	120	335	-
Carbono Total (% en peso)	7.3	19	15
Sílice de alta pureza	No	Si	No
Protección de los silanoles libres	Si	Si	Si
Retención Tolueno (k)	0.7	1.8	1.1
Actividad de los grupos silanol	Moderada	Baja	Moderada
Asimetría para Quinizarín (actividad metálica)	2.42 Alta	-	-

Con objeto de estudiar los efectos de los LIs tanto en la separación cromatográfica como en la detección Vis-UV y fluorescente, se han seleccionado las seis AHs, NH, H, Trp-P-2, Trp-P-1, AαC y MeAαC, que presentan fluorescencia nativa y por tanto se puedan detectar mediante ambos sistemas.

Por otra parte, se estudiará el comportamiento óptico de las AHs en presencia de los LIs. Estos estudios nos permitirán seleccionar las longitudes de onda óptimas para llevar a cabo la detección fluorescente, así como las longitudes de onda adecuadas para la detección Vis-UV.

III.2.1 Separación cromatográfica

El contenido de disolvente orgánico y el pH en la fase móvil son los factores experimentales que se controlan con más frecuencia en cromatografía líquida en fase inversa, debido a sus importantes efectos sobre la retención y/o selectividad.

Para seleccionar el porcentaje de acetonitrilo y el pH adecuados para realizar este estudio, atenderemos a los resultados recogidos en el Capítulo II. A partir de dichos resultados se pueden obtener algunas conclusiones que pueden ayudar a la hora de elegir las condiciones

adecuadas, sin perder de vista que la separación y resolución de todos los analitos no será posible en todas las ocasiones, ya que el estudio comprende el uso de tres LIs como aditivos y tres fases estacionarias distintas. Si nos fijamos en el gradiente de elución empleado para la separación de las aminas menos polares, descrito en el apartado IV.3.1 de la Parte Experimental, se observó que, en primer lugar, el pH de la fase móvil debe ajustarse a 3.6, con objeto de asegurar la completa ionización de las AHs. Por otra parte, el porcentaje de acetonitrilo varía entre el 12 y el 25% para la elución de las cuatro primeras aminas. Para las aminas A α C y MeA α C, es necesario aumentar el porcentaje de disolvente orgánico para favorecer su elución.

Según algunos autores [169], a medida que se modifica la concentración de los LIs en la fase móvil, la retención de los analitos varía. Si se realiza un gradiente de elución con objeto de obtener una mejor separación de los analitos, el disolvente orgánico utilizado para llevar a cabo el gradiente, acetonitrilo en nuestro caso, va a modificar la retención de los analitos en la fase estacionaria. Si el principal objetivo de este Capítulo es estudiar el efecto de los LIs en la determinación cromatográfica de las AHs, parece lógico que se debe trabajar en modo isocrático en lugar de utilizar un gradiente de elución.

Teniendo en cuenta los aspectos comentados, se establece como composición de la fase móvil un porcentaje de acetonitrilo de 18% y un pH de la fase acuosa de 3.6.

III.2.2 Comportamiento óptico de las AHs en presencia de LIs

Para estudiar el comportamiento óptico de las AHs en presencia de los LIs, se han realizado espectros de absorción Vis-UV y fluorescencia de disoluciones de cada una de las aminas consideradas en este estudio en presencia de los distintos líquidos iónicos a una concentración 1 mM. El valor de pH se fijó en 3.6 y el contenido de acetonitrilo en el 18% (v/v), con el fin de reproducir las condiciones de la fase móvil que posteriormente se van a utilizar en la separación cromatográfica, y que se han descrito en el apartado anterior. Asimismo, con fines comparativos se ha estudiado el comportamiento de las aminas en presencia de 10 mM de TEA (aditivo más frecuentemente utilizado) y en ausencia de aditivo.

En las Figuras III.2.1 y III.2.2 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de las aminas en presencia de cada uno de los LIs estudiados, de TEA y en ausencia de aditivo. Puede observarse que las longitudes de onda de los máximos de emisión, cuyos

valores se recogen en la Tabla III.2.2, son similares en los distintos medios estudiados. Sin embargo, sí que se observan diferencias en las intensidades máximas obtenidas.

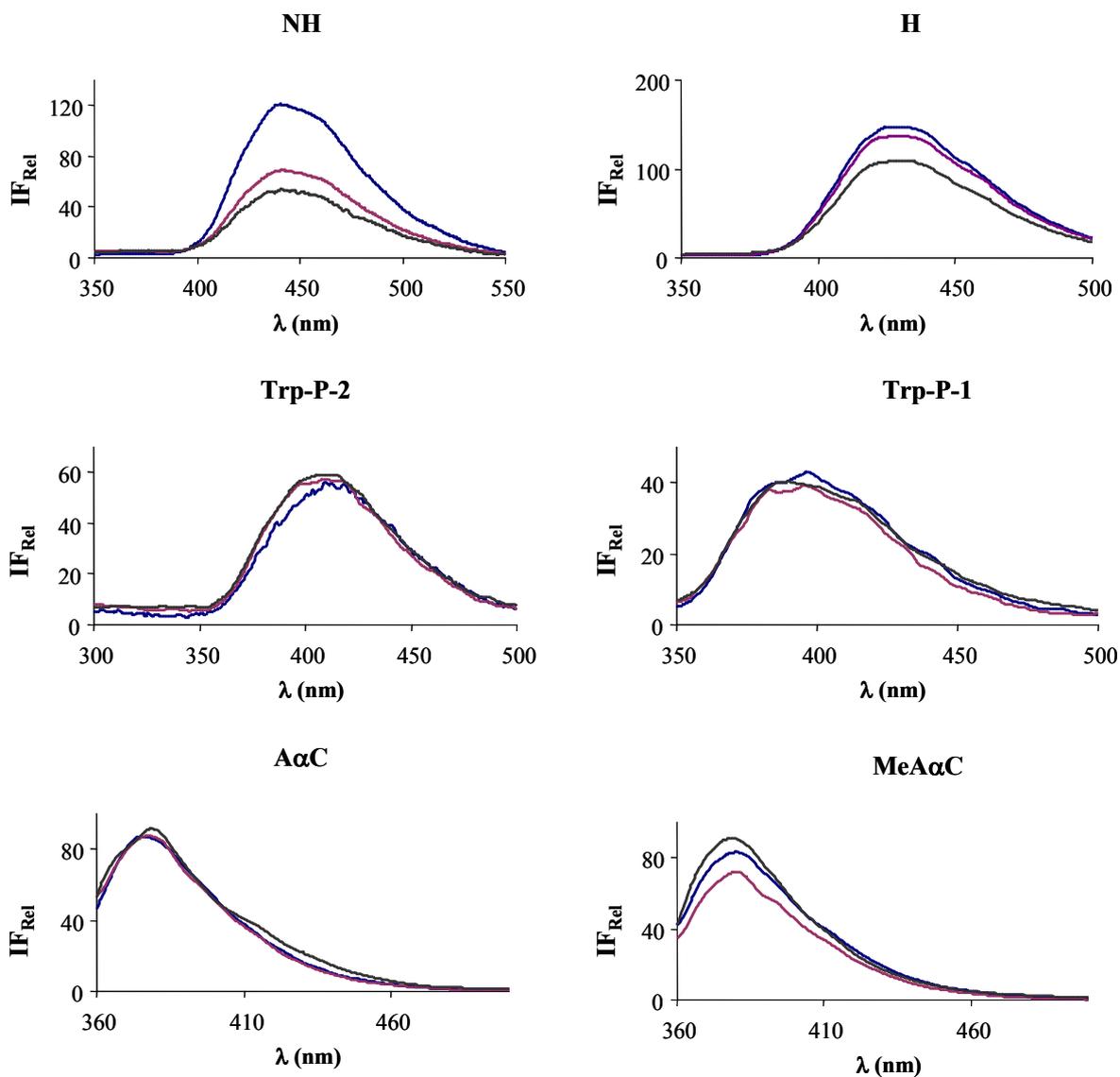


Figura III.2.1. Espectros de emisión de las AHs en presencia de 1 mM de los LIs estudiados. (—) BMIIm-BF₄, (—) HMIIm-BF₄ y (—) MOIm-BF₄. λ_{ex} recogidas en la Tabla III.2.2.

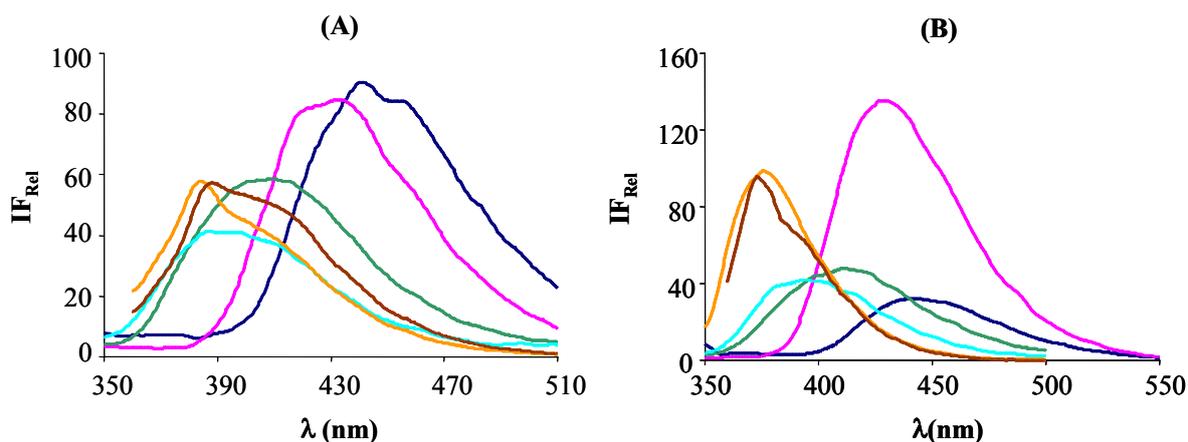


Figura III.2.2. Espectros de emisión de las AHs (A) en TEA 10 mM y (B) en ausencia de aditivo.

AHs: (—) NH, (—) H, (—) Trp-P-2, (—) Trp-P-1, (—) AαC y (—) MeAαC.

Tabla III.2.2. Longitudes de onda de excitación y emisión máximas.

Compuesto	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$
NH	300	442
H	299	432
Trp-P-2	264	410
Trp-P-1	263	416
AαC	334	377
MeAαC	340	382

Con objeto de cuantificar el efecto que se produce en la intensidad de fluorescencia emitida por las AHs en presencia de los LIs, se determinaron los Factores de Sensibilización (*FS*). Estos Factores se definen como la relación entre la intensidad relativa de fluorescencia en presencia de los LIs, IF_{LI} , y la obtenida en medio acuoso (en ausencia de aditivo), IF_{H_2O} :

$$FS = \frac{IF_{LI}}{IF_{H_2O}}$$

Los valores de *FS* obtenidos para las aminas consideradas en este estudio en presencia de los distintos líquidos iónicos, a una concentración 1 mM, se muestran en la Tabla III.2.3. Como se observa, los valores de *FS* más altos se obtuvieron para NH en presencia de los tres

LIs estudiados, disminuyendo su valor a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica del LI. El resto de las AHs presentan FS próximos a 1, y para todas las aminas, excepto para MeA α C, el BMIm-BF₄ da lugar a los valores más altos de FS .

Tabla III.2.3. Factores de Sensibilización de las aminas en presencia de 1 mM de los aditivos indicados.

Compuesto	FS_{LI/H_2O}			$FS_{BMIm-BF_4/TEA}$
	BMIm-BF ₄	HMIm-BF ₄	MOIm-BF ₄	
NH	3.74	2.11	1.65	0.930
H	1.26	1.20	0.943	0.957
Trp-P-2	1.00	0.934	0.967	1.03
Trp-P-1	1.07	0.975	0.975	1.01
AαC	0.903	0.872	0.741	1.06
MeAαC	0.899	1.00	0.986	0.930

Con la finalidad de comparar la sensibilización obtenida en presencia de los LIs con la que se presenta en presencia de TEA, se calcularon los FS en relación con la señal de fluorescencia obtenida usando como aditivo TEA: IF_{LI}/IF_{TEA} . En la Tabla III.2.3 se recogen los valores de FS para el BMIm-BF₄, el LI que conduce a los mayores factores de sensibilización. Como puede observarse, para todas las aminas los FS obtenidos son próximos a 1, lo que pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia obtenida en presencia de ambos aditivos es similar.

Por último, se estudió la influencia de la concentración de LI en la intensidad de fluorescencia emitida por las aminas. Para llevar a cabo este estudio, se realizaron espectros de disoluciones con una concentración constante de cada una de las aminas y concentraciones comprendidas entre 1 y 15 mM de BMIm-BF₄. En la Figura III.2.3 se muestran los espectros de emisión obtenidos para cada una de las AHs, usando como longitudes de onda de excitación las recogidas en la Tabla III.2.2. Asimismo, para cada una de las aminas se ha incluido el espectro de emisión obtenido en ausencia de aditivo.

Atendiendo a su comportamiento, las distintas aminas pueden clasificarse en tres grupos diferenciados:

- El primer grupo está compuesto por NH y H. La intensidad de fluorescencia de estas aminas aumenta con la concentración de BMIm-BF₄. Este comportamiento es especialmente acusado a bajas concentraciones (hasta 1 mM) en el caso de NH, pero a concentraciones superiores las intensidades permanecen prácticamente constantes.
- El segundo grupo está formado por Trp-P-2 y Trp-P-1. Para estas aminas las intensidades aumentan cuando la concentración del líquido iónico aumenta desde 1 a 10 mM, pero permanecen constantes a concentraciones superiores.
- Por último, el grupo formado por las aminas A α C y MeA α C presentan una disminución en sus intensidades de fluorescencia cuando la concentración del LI aumenta desde 1 a 10 mM, aumentando nuevamente a concentraciones superiores.

En la Figura III.2.4 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones de BMIm-BF₄ a diferentes concentraciones. Como puede observarse el BMIm-BF₄ presenta un máximo de emisión a 430 nm, solamente detectable a elevadas concentraciones de LI. Este máximo puede solaparse con los máximos de emisión de las aminas estudiadas, si las longitudes de onda de excitación son suficientemente próximas. Esta es la razón por la que las aminas Trp-P-2, Trp-P-1, A α C y MeA α C presenten una banda a longitudes de onda superiores a 400 nm en sus espectros de emisión en presencia de altas concentraciones del líquido iónico.

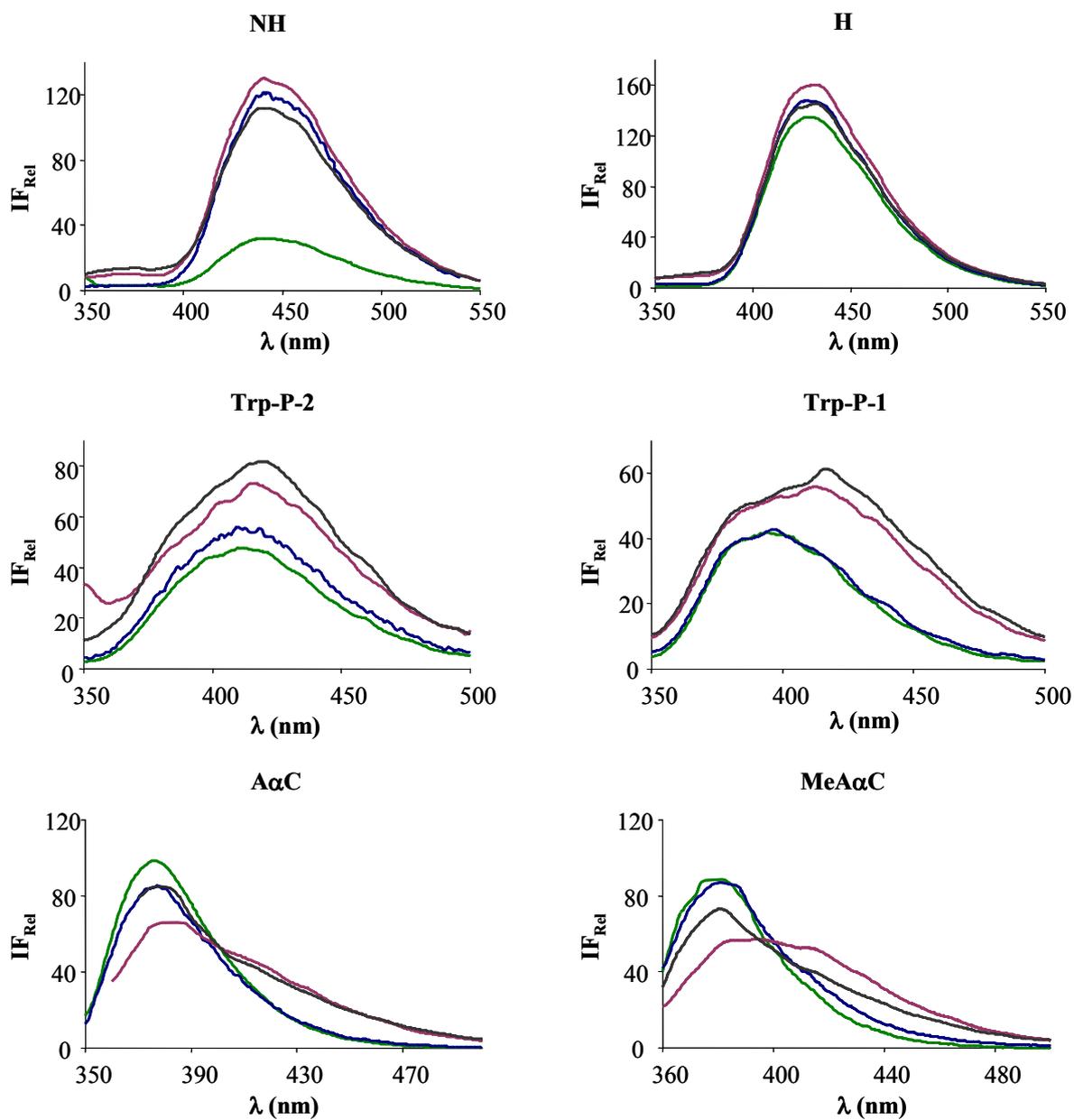


Figura III.2.3. Espectros de emisión de las AHs estudiadas en ausencia de aditivo (—) y a diferentes concentraciones de BMIm-BF₄: (—) 1 mM, (—) 10 mM y (—) 15 mM.

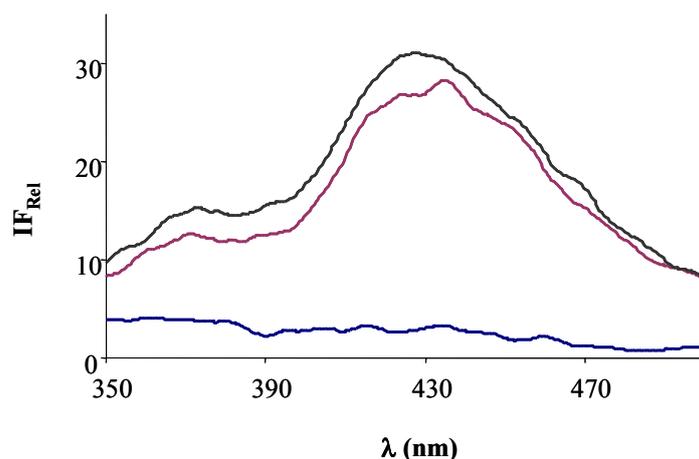


Figura III.2.4. Espectros de emisión del LI BMIm-BF₄ a diferentes concentraciones: (—) 1 mM, (—) 10 mM y (—) 15 mM. $\lambda_{exc} = 264$ nm.

La Figura III.2.5 (A) muestra los espectros de absorción de disoluciones 1 mM de cada uno de los LIs y la Figura III.2.5 (B) muestra los espectros de absorción de las AHs en 1 mM de BMIm-BF₄. Como puede observarse, los espectros de absorción de los tres LIs son muy similares, presentando un máximo de absorción sobre los 200 nm, máximo que no se solapa con los de las AHs estudiadas, cuyos máximos de absorción se sitúan a longitudes de onda comprendidas entre 235 y 390 nm.

Por otra parte, los tres LIs presentan un máximo de mucha menor intensidad para longitudes de onda comprendidas entre 240 y 280 nm, que también se ha encontrado en otros LIs [171]. Con la excepción de HMIm-BF₄, como puede observarse en la Figura III.2.5 (A), las absorbancias de este máximo son despreciables comparadas con las que presentan las AHs en este intervalo de longitudes de onda.

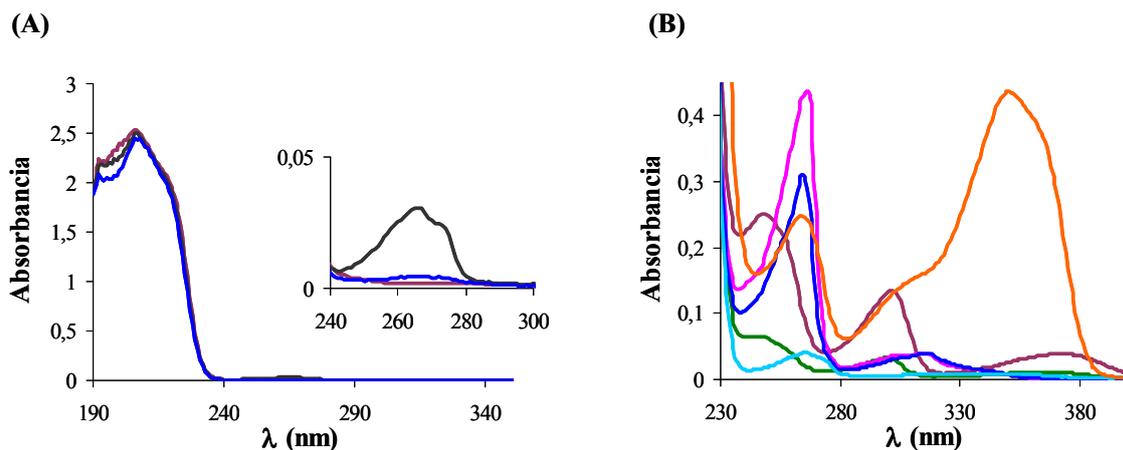


Figura III.2.5. Espectros de absorción de (A) los líquidos iónicos, (—) 1 mM BMIm-BF₄, (—) 1 mM HMIm-BF₄ y (—) MOIm-BF₄ y (B) de las AHs en 1 mM BMIm-BF₄: (—) NH, (—) H, (—) Trp-P-2, (—) Trp-P-1, (—) AαC y (—) MeAαC.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este apartado, la concentración de los LIs es un parámetro que se ha de tener en cuenta cuando estos LIs se utilizan como aditivos en cromatografía líquida y, especialmente, cuando se emplea detección fluorescente. En este sentido, la fluorescencia debida a los LIs estudiados no puede ser ignorada e incluso, en algunos casos, podría incrementar la respuesta fluorescente de algunas AHs. Este incremento en la fluorescencia podría dar lugar a métodos cromatográficos más selectivos y sensibles, y a mejoras en los límites de detección.

Como el principal objetivo de este apartado es estudiar los efectos de un grupo de LIs como aditivos a la fase móvil, se eligieron longitudes de onda fijas para llevar a cabo las detecciones Vis-UV y fluorescencia. Para la detección Vis-UV, se seleccionó 263 nm como longitud de onda más adecuada. Para la detección fluorescente, con objeto de favorecer aquellas aminas menos sensibles (NH, H y AαC), se consideraron como longitudes de onda óptimas 410 nm y 264 nm como λ_{em} y λ_{ex} , respectivamente.

III.2.3 Líquidos iónicos de la familia alquilimidazolio como aditivos de la fase móvil en HPLC

Efecto enmascarante de los grupos silanol residuales por los LIs

Como se ha comentado anteriormente, el principal problema a la hora de determinar cromatográficamente las AHs es la posible interacción entre estos compuestos básicos y los grupos silanol residuales sobre las fases convencionales de base sílice. Para evitar este efecto, es usual añadir un agente enmascarante de los grupos silanol, siendo la trietilamina uno de los bloqueantes más frecuentemente utilizados.

Para estudiar el efecto enmascarante de los LIs en la determinación por HPLC de las AHs, se han seleccionado tres líquidos iónicos de la familia del alquilimidazolio (1-butil-3-metilimidazolio, 1-hexil-3-metilimidazolio y 1-metil-3-octilimidazolio tetrafluoroborato) y tres fases estacionarias que presentan actividad de los grupos silanol moderada o baja.

De acuerdo con el modelo desarrollado por Horváth *et al.* [177, 178], para evaluar la potencia supresora de los agentes enmascarantes, se asume que el analito puede enlazarse independientemente de dos formas diferentes a la superficie de una fase estacionaria que contiene grupos silanol y grupos alquílicos enlazados covalentemente. Uno de los mecanismos es puramente hidrofóbico y el otro es silanofílico, porque el analito es capaz de interactuar tanto con los grupos silanol como con las cadenas alquílicas. Asumiendo que las respectivas constantes de equilibrio son K_1 y K_2 , el factor de retención, k , puede expresarse como la suma de los factores de retención por enlaces hidrofóbicos, k_1 , y silanofílicos, k_2 , y φ_1 y φ_2 son las respectivas razones de fase de los lugares de enlace disponibles:

$$k = \varphi_1 \cdot K_1 + \varphi_2 \cdot K_2 = k_1 + k_2 \quad (1)$$

El enlace reversible del agente enmascarante A a la fase estacionaria se caracteriza por la correspondiente constante de equilibrio:

$$K_A = \frac{[SiOH - A]}{[SiOH] \cdot [A]} \quad (2)$$

donde $[A]$ es la concentración del agente enmascarante en la fase móvil, $[SiOH]$ es la concentración de silanoles y $[SiOH \cdot A]$ es la concentración del complejo formado.

Se asume que, después del enlace del agente enmascarante, la concentración superficial de los silanoles accesibles, $[SiOH]$, y la correspondiente razón de fases, φ_2 , se

reducen, mientras que φ_1 no cambia. Por lo tanto, la razón de fases para los silanoles vendría expresada como:

$$\varphi_2 = \frac{\varphi_{2,max.}}{1 + K_A[A]} \quad (3)$$

donde $\varphi_{2,max}$ es la razón de fases de los silanoles en ausencia de agente enmascarante. El valor del factor de retención total vendría dado por:

$$k = k_1 + \frac{k_2}{1 + K_A[A]} \quad (4)$$

El factor de retención, k , obtenido para una cierta concentración de bloqueante en la fase móvil puede restarse del factor de retención, k_0 , obtenido en su ausencia:

$$k_0 - k = \frac{k_2 K_A [A]}{(1 + K_A [A])} \quad (5)$$

Reordenando esta última ecuación se obtiene:

$$\frac{[A]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[A]}{k_2} \quad (6)$$

donde k_0 es el factor de retención obtenido en ausencia de aditivo y k es el factor de retención obtenido para una cierta concentración de supresor, $[A]$, líquidos iónicos en nuestro caso. K_2 es la contribución silanofílica al mecanismo de retención de los analitos y K_A es la constante de enlace entre el silanol y el agente supresor y muestra la habilidad de este agente para bloquear los silanoles libres.

Los valores de K_A están relacionados con los tiempos de retención de los analitos, valores altos de K_A indican un complejo silanol-supresor más estable y, por lo tanto, menor retención de los analitos en la fase estacionaria.

La representación gráfica de los valores de $[A]/(k_0-k)$ frente a la concentración de supresor en la fase móvil debe conducir a líneas rectas, cuyas pendientes permitirán el cálculo del factor de retención silanofílico (k_2) y las ordenadas en el origen la constante del complejo silanol-agente supresor (K_A).

La Figura III.2.6 muestra las rectas obtenidas al representar $[LI]/(k_0-k)$ frente a la concentración de LI para NH, usando las tres fases estacionarias y como supresores los tres LIIs considerados en este estudio. Los valores de las ordenadas en el origen y de las pendientes, para cada una de las aminas consideradas, se han agrupado en la Tabla III.2.4,

junto con los coeficientes de correlación correspondientes a las referidas rectas. Como puede observarse, para los tres LIs en las columnas NovaPak® y TSK-Gel ODS 80™ se obtienen buenas linealidades, con coeficientes de correlación comprendidos entre 0.998 y 0.999. Sin embargo, para la columna ABZ+plus con los grupos silanol enlazados y, por lo tanto, con una baja actividad de los mismos, se obtienen coeficientes de correlación inferiores.

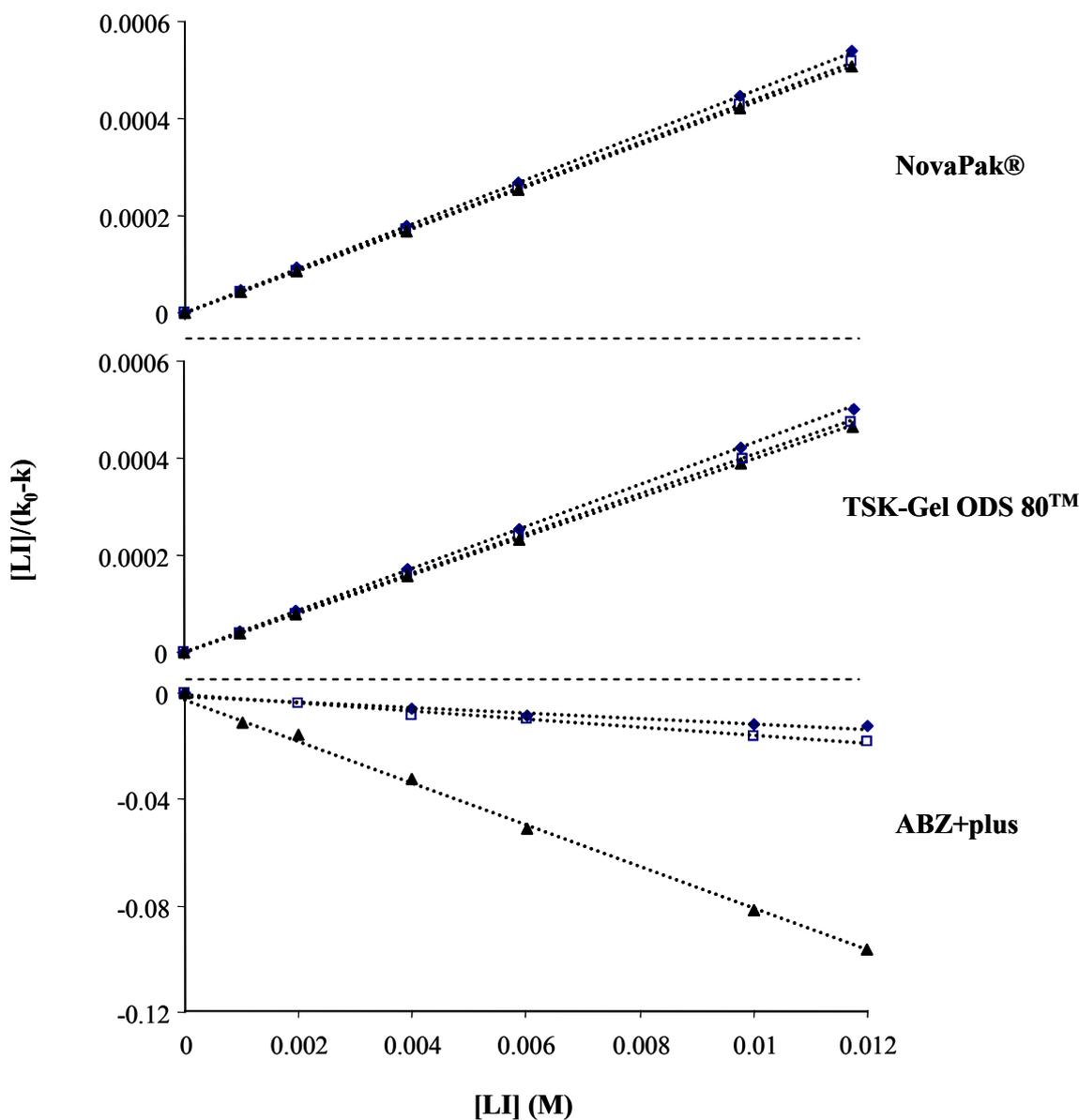


Figura III.2.6. Representación de $[LI]/(k_0-k)$ vs $[LI]$ para la retención de NH en las tres columnas empleadas y con los tres LIs estudiados: (♦) BMIm-BF₄, (□) HMIm-BF₄ y (▲) MOIm-BF₄.

Tabla III.2.4. Parámetros de las relaciones lineales [LJ]/(k₀-k) y la concentración de LI.

Compuesto	NovaPak®			TSK-Gel ODS 80™			ABZ+plus		
	(a ± SD) x 10 ⁵	(b ± SD) x 10 ⁷	R	(a ± SD) x 10 ⁵	(b ± SD) x 10 ⁷	R	a ± SD	(b ± SD) x 10 ⁴	R
BMIIm-BF₄									
NH	4500 ± 13	8.8 ± 8.4	0.999	4200 ± 6	6.5 ± 3.1	0.999	-1.0 ± 0.11	-10.0 ± 8.3	0.980
H	3400 ± 9	7.3 ± 5.6	0.999	3400 ± 5	5.0 ± 2.7	0.999	-0.72 ± 0.08	-7.0 ± 6.0	0.977
Trp-P-2	2400 ± 7	5.8 ± 4.6	0.999	2300 ± 6	4.6 ± 2.9	0.999	-0.30 ± 0.03	-3.0 ± 2.0	0.982
Trp-P-1	2200 ± 8	8.1 ± 5.3	0.999	1500 ± 5	4.3 ± 2.6	0.999	-0.20 ± 0.02	-2.0 ± 1.0	0.985
AαC	1400 ± 17	4.2 ± 6.4	0.999	-	-	-	-0.25 ± 0.008	-1.0 ± 0.31	0.998
MeAαC	1100 ± 10	3.7 ± 3.3	0.999	-	-	-	-0.14 ± 0.006	-0.34 ± 0.21	0.996
HMIIm-BF₄									
Compuesto	(a ± SD) x 10 ⁵	(b ± SD) x 10 ⁷	R	(a ± SD) x 10 ⁵	(b ± SD) x 10 ⁷	R	a ± SD	(b ± SD) x 10 ⁴	R
NH	4300 ± 5	4.1 ± 3.4	0.999	4000 ± 7	2.5 ± 2.5	0.999	-1.5 ± 0.09	-9.0 ± 6.0	0.990
H	3200 ± 3	3.1 ± 2.3	0.999	3200 ± 4	2.3 ± 1.5	0.999	-1.2 ± 0.08	-6.4 ± 4.6	0.991
Trp-P-2	2200 ± 3	3.0 ± 2.1	0.999	2100 ± 4	2.1 ± 1.3	0.999	-0.45 ± 0.04	-2.3 ± 2.0	0.987
Trp-P-1	2000 ± 3	3.2 ± 1.5	0.999	1400 ± 3	1.6 ± 1.0	0.999	-0.30 ± 0.02	-1.2 ± 1.3	0.988
AαC	1300 ± 2	2.8 ± 1.3	0.999	-	-	-	-0.15 ± 0.03	-1.5 ± 1.9	0.935
MeAαC	1000 ± 8	2.3 ± 2.8	0.999	-	-	-	-0.22 ± 0.02	-1.2 ± 1.3	0.978
MOIm-BF₄									
Compuesto	(a ± SD) x 10 ⁵	(b ± SD) x 10 ⁷	R	(a ± SD) x 10 ⁵	(b ± SD) x 10 ⁷	R	a ± SD	(b ± SD) x 10 ³	R
NH	4200 ± 3	2.5 ± 1.9	0.999	3880 ± 5	2.1 ± 3.4	0.999	-7.8 ± 0.43	-2.5 ± 2.2	0.992
H	3200 ± 2	1.4 ± 1.1	0.999	3070 ± 3	1.3 ± 2.1	0.999	-7.8 ± 0.43	-2.5 ± 2.2	0.992
Trp-P-2	2200 ± 1	0.16 ± 0.29	0.999	2060 ± 1	0.55 ± 0.77	0.999	-1.6 ± 0.06	-0.4 ± 0.3	0.996
Trp-P-1	2000 ± 1	0.59 ± 0.41	0.999	1360 ± 8	0.37 ± 0.51	0.999	-0.92 ± 0.03	-0.2 ± 0.1	0.997
AαC	1400 ± 20	5.0 ± 1.3	0.999	-	-	-	-0.68 ± 0.07	-0.1 ± 0.2	0.984
MeAαC	1000 ± 33	4.8 ± 2.6	0.998	-	-	-	-0.42 ± 0.10	-2458 ± 0.2	0.918

a = Pendiente de la relación lineal [LJ]/(k₀-k) vs [LI]; b = Ordenada en el origen de la relación lineal [LJ]/(k₀-k) vs [LI]

(-)No se dispone de valores de k₀ puesto que estas aminas presentan tiempos de retención en ausencia de aditivos fuera del dominio experimental (240 min).

Los factores de retención silanofílicos para cada una de las aminas, y para cada una de las fases estacionarias en presencia de los distintos LI, se han agrupado en la Tabla III.2.5.

Tabla III.2.5. Factores de retención silanofílicos (k_2).

BMIm-BF₄			
Compuesto	NovaPak®	TSK-Gel ODS-80™	ABZ+plus
NH	22.42	23.69	-0.7596
H	29.59	29.59	-1.387
Trp-P-2	42.37	43.86	-3.364
Trp-P-1	46.30	66.22	-5.094
AαC	69.44	-	-3.932
MeAαC	90.91	-	-6.968
HMIm-BF₄			
Compuesto	NovaPak®	TSK-Gel ODS-80™	ABZ+plus
NH	23.31	25.06	-0.6617
H	30.86	31.55	-0.8166
Trp-P-2	44.44	47.17	-2.212
Trp-P-1	50.25	70.92	-3.347
AαC	74.63	-	-6.588
MeAαC	100.0	-	-4.632
MOIm-BF₄			
Compuesto	NovaPak®	TSK-Gel ODS-80™	ABZ+plus
NH	23.70	25.71	-0.1276
H	31.45	32.46	-7.834
Trp-P-2	45.45	48.54	-0.6275
Trp-P-1	50.76	73.53	-1.083
AαC	71.43	-	-1.479
MeAαC	96.15	-	-2.396

(-) No se dispone de valores de k_0 puesto que estas aminas presentan tiempos de retención en ausencia de aditivos fuera del dominio experimental (240 min).

Puede observarse que:

- Para las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM, con una actividad de los grupos silanol moderada, independientemente del LI utilizado como supresor, los valores de retención silanofílicos son similares para ambas fases estacionarias, aunque ligeramente superiores para la TSK-Gel ODS 80TM. Por otra parte, para ambas fases estacionarias, los factores de retención aumentan a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica del líquido iónico, excepto para A α C y MeA α C. Para estas aminas los mayores factores de retención silanofílicos se obtienen cuando se emplea el LI HMIm-BF₄.
- Por su parte, la fase estacionaria ABZ+plus, debido a su naturaleza, presenta un comportamiento muy diferenciado, con valores de factores de retención silanofílicos negativos, lo que pone de manifiesto la baja actividad de los grupos silanol residuales de esta fase estacionaria.

Según se ha comentado anteriormente, conocidos los valores de retención silanofílicos, las ordenadas en el origen de las rectas obtenidas al representar $[LI]/(k_0-k)$ frente a la concentración de LI, según la ecuación (6), permiten determinar las constantes de enlace silanofílico (K_A). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los factores de retención silanofílica, para el cálculo de K_A sólo se han tomado en consideración las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM. Las constantes de enlace obtenidas para las seis aminas estudiadas, cuando se utilizan los tres LIs, se muestran en la Tabla III.2.6.

Como puede observarse, para ambas fases estacionarias los valores de K_A aumentan a medida que aumenta el número de átomos de carbono en la cadena alquílica del LI, obteniéndose, en general, los valores más altos para el LI MOIm-BF₄. El mayor efecto supresor presentado por este LI debe ser causado por su carácter hidrofóbico y el complejo silanol-imidazolio debe establecerse por interacciones hidrofóbicas entre la cadena alquílica del LI y la fase estacionaria. En la Figura III.2.7 se muestra la correlación entre los valores de K_A obtenidos para las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM.

Tabla III.2.6. Constantes de estabilidad del complejo silanol-LI (K_A) y concentración recomendada de LI en la fase móvil (C_{LI}).

Compuesto	NovaPak®		TSK-Gel ODS 80 TM	
	$K_A \times 10^{-4} (M^{-1})$	$C_{LI} (mM)$	$K_A \times 10^{-4} (M^{-1})$	$C_{LI} (mM)$
BMIm-BF₄				
NH	4.95	0.383	6.03	0.315
H	4.83	0.393	6.76	0.281
Trp-P-2	3.93	0.483	4.56	0.417
Trp-P-1	2.70	0.704	3.77	0.503
A α C	3.60	0.528	-	-
MeA α C	2.75	0.691	-	-
HMIm-BF₄				
NH	10.7	0.177	13.3	0.143
H	10.8	0.176	15.8	0.120
Trp-P-2	7.50	0.253	10.6	0.179
Trp-P-1	6.63	0.286	7.05	0.269
A α C	4.47	0.425	-	-
MeA α C	5.00	0.380	-	-
MOIm-BF₄				
NH	21.1	0.090	19.4	0.097
H	31.8	0.060	30.8	0.062
Trp-P-2	110	0.017	34.3	0.055
Trp-P-1	32.8	0.060	34.0	0.056
A α C	2.80	0.679	-	-
MeA α C	2.01	0.913	-	-

(-) No se disponen de valores de k_0 puesto que estas aminas presentan en ausencia de aditivo tiempos de retención fuera del dominio experimental (240 min).

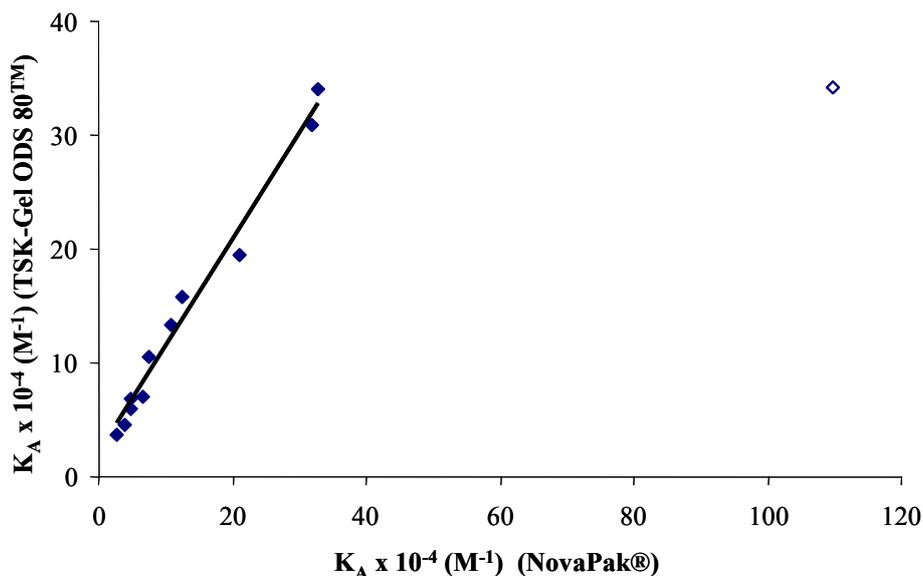


Figura III.2.7. Correlación entre los valores de K_A obtenidos para la columna NovaPak® frente a los valores de K_A obtenidos para la columna TSK-Gel ODS 80™. \diamond = anómalo.

Como puede observarse en la Figura III.2.7, existe una buena correlación ($R = 0.986$) entre los valores de K_A obtenidos para las dos fases estacionarias, con una pendiente de 0.933 ± 0.113 y una ordenada en el origen de 2.13 ± 1.90 , para un nivel de confianza de 0.05. Sin embargo, encontramos un punto anómalo en dicha correlación correspondiente a la amina Trp-P-2 cuando se utiliza en LI MOIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil. Esto puede deberse a que al emplear este LI se produce una gran disminución de la retención, conduciendo a valores de k muy inferiores a k_0 .

Una de las conclusiones prácticas más importante que se puede deducir a partir de los valores de K_A obtenidos según el modelo de Horváth, es determinar la concentración de LI recomendada (C_{LI}). C_{LI} es la concentración de LI que reduce los efectos de los grupos silanol residuales en un porcentaje prefijado [178]. Estos valores pueden servir de guía en la selección de las concentraciones adecuadas de LIs que deben añadirse a la fase móvil.

Los valores de las concentraciones recomendadas de cada LI para reducir los efectos de los grupos silanol residuales un 95% (C_{LI} calculada como $20/K_A$) [178] se muestran en la Tabla III.2.6. Como puede observarse, la C_{LI} se encuentra comprendida entre 0.017 y 0.913 mM para las dos fases estacionarias. Los tiempos de retención más bajos se obtienen cuando

se emplea MOIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil y, por consiguiente, para este LI se obtienen los menores valores de C_{LI}, tal y como puede observarse en la Tabla III.2.6.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este apartado, la concentración más baja de LI se fijó en 1 mM para asegurar la supresión del efecto de los grupos silanol residuales en un 95% en las dos fases estacionarias.

Efecto de los LIs en la retención y perfil de los picos cromatográficos

A partir de los resultados obtenidos en la sección anterior, se puede concluir que cuando los LIs se añaden en pequeñas cantidades a la fase móvil, éstos actúan como agentes supresores de los grupos silanol residuales y modifican los tiempos de retención de las AHs.

Las Figuras III.2.8 (A, B y C) muestran los cromatogramas obtenidos, para todas las AHs, usando detección fluorescente en las fases estacionarias NovaPak® (A), TSK-Gel ODS 80TM (B) y ABZ+plus (C), y en presencia de diferentes concentraciones de LIs como aditivos a la fase móvil. Como se observa, la adición de los LIs da lugar a una reducción importante de los tiempos de retención con las columnas NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM. Esta reducción de los tiempos de retención, superior al 80% en algunos de los casos, aumenta con el número de átomos de carbono en la cadena alquílica del LI y es máxima para la columna TSK-Gel ODS 80TM. Los menores tiempos de retención para ambas columnas se obtienen en presencia de MOIm-BF₄, el LI con mayor efecto supresor tal como se expuso anteriormente.

En contraste, la adición de los LIs produce un ligero aumento de los tiempos de retención con la columna ABZ+plus, siendo la retención prácticamente independiente de la longitud de la cadena alquílica del LI utilizado. Esto concuerda con los resultados comentados anteriormente en relación a la baja actividad de los grupos silanol residuales de esta fase estacionaria, ya que prácticamente todos los grupos silanol de esta fase estacionaria están enlazados con grupos amida.

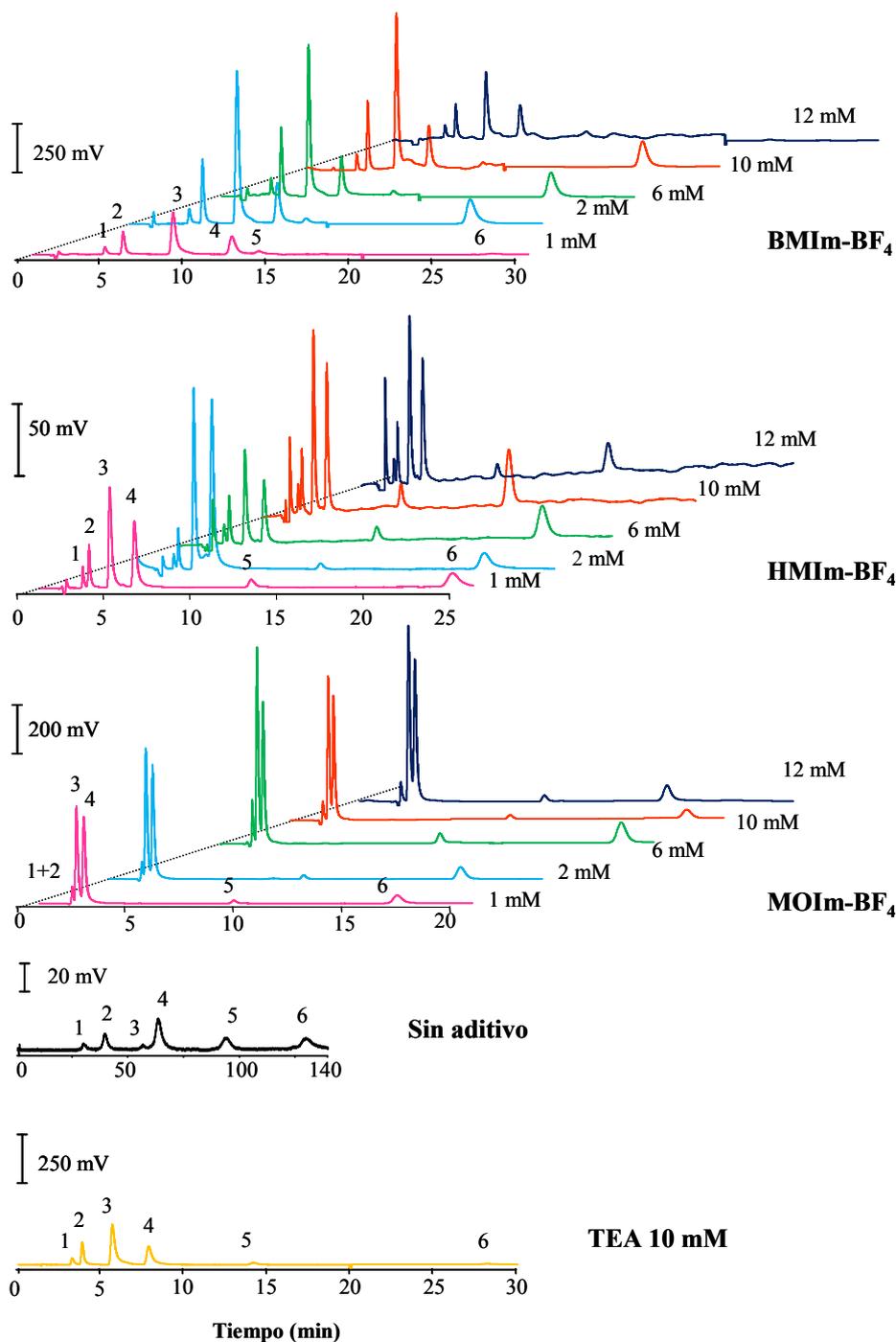


Figura III.2.8 (A). Cromatogramas de las AHs utilizando diferentes concentraciones de LI, TEA 10 mM y sin aditivo en la fase móvil con la columna NovaPak® y detección fluorescente. Orden de elución de las aminas y su concentración: (1) NH (1.98 ng mL⁻¹), (2) H (0.672 ng mL⁻¹), (3) Trp-P-2 (0.608 ng mL⁻¹), (4) Trp-P-1 (0.640 ng mL⁻¹), (5) AαC (3.31 ng mL⁻¹), y (6) MeAαC (0.320 ng mL⁻¹). El contenido de acetonitrilo es del 18% (v/v) en todos los casos.

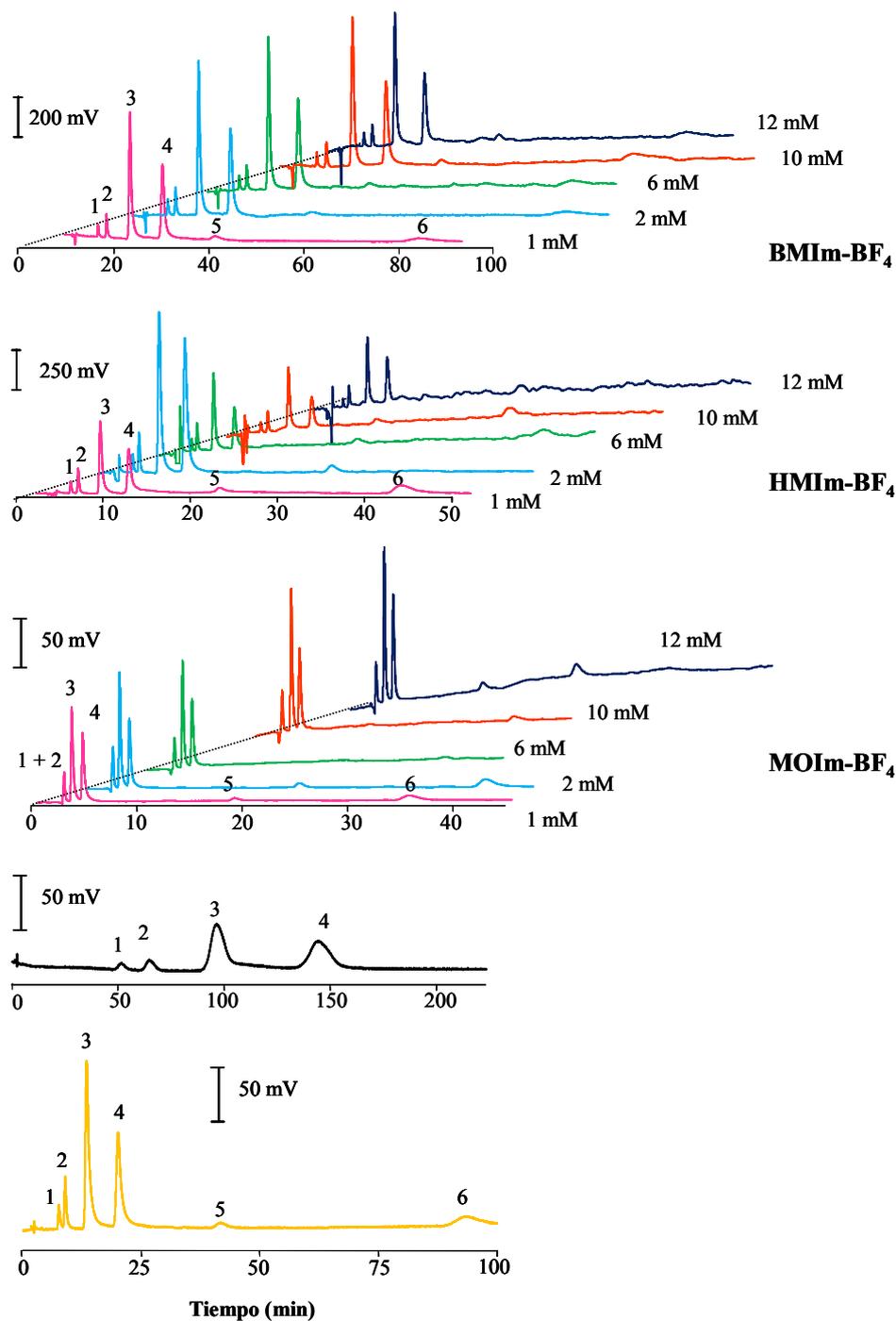


Figura III.2.8 (B). Cromatogramas de las AHs utilizando diferentes concentraciones de LIs, TEA 10 mM y sin aditivo en la fase móvil con la columna TSK-Gel ODS 80TM y detección fluorescente. Orden de elución de las aminas y su concentración: (1) NH (1.98 ng mL⁻¹), (2) H (0.672 ng mL⁻¹), (3) Trp-P-2 (0.608 ng mL⁻¹), (4) Trp-P-1 (0.640 ng mL⁻¹), (5) AαC (3.31 ng mL⁻¹), y (6) MeAαC (0.320 ng mL⁻¹). El contenido de acetonitrilo es del 18% (v/v) en todos los casos.

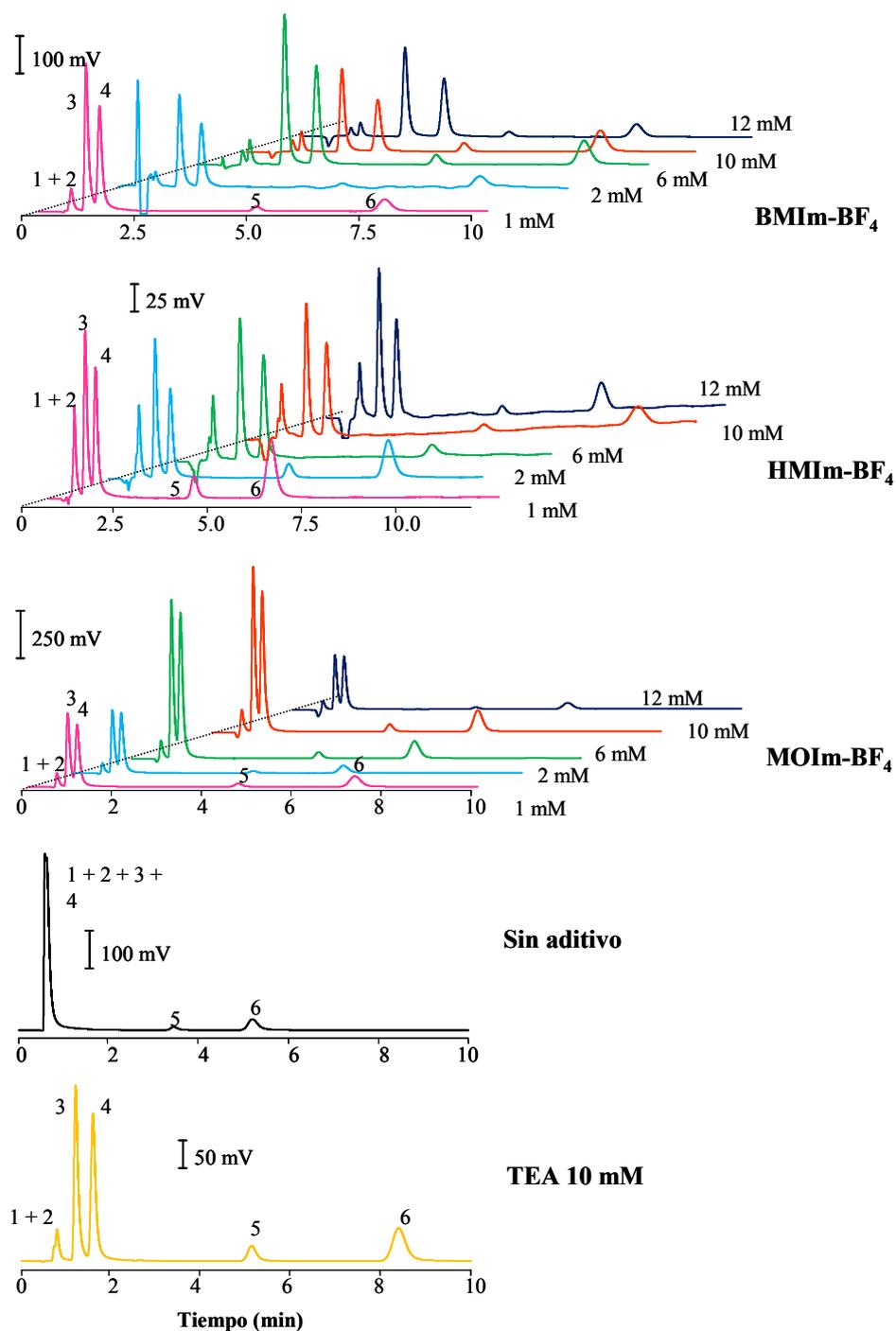


Figura III.2.8 (C). Cromatogramas de las AHs utilizando diferentes concentraciones de LIs, TEA 10 mM y sin aditivo en la fase móvil con la columna ABZ+plus y detección fluorescente. Orden de elución de las aminas y su concentración: (1) NH (1.98 ng mL⁻¹), (2) H (0.672 ng mL⁻¹), (3) Trp-P-2 (0.608 ng mL⁻¹), (4) Trp-P-1 (0.640 ng mL⁻¹), (5) A α C (3.31 ng mL⁻¹), y (6) MeA α C (0.320 ng mL⁻¹). El contenido de acetonitrilo es del 18% (v/v) en todos los casos.

El estudio de la influencia de la concentración de LI en la fase móvil en la retención, pone de manifiesto que, en general, los tiempos de retención disminuyen cuando la concentración de los LIs aumenta desde 1 a 2 mM en las fases estacionarias con una actividad moderada de los grupos silanol (Figuras III.2.8 A y B). Estas disminuciones son mayores con el incremento de la cadena alquílica en los LIs. A concentraciones superiores a 2 mM, los tiempos de retención se mantienen prácticamente constantes. En cambio, con la columna ABZ+plus se produce el efecto contrario aumentando los tiempos de retención al aumentar la concentración de los LIs (Figura III.2.8 C).

Al comparar los cromatogramas obtenidos con los LIs y con TEA, en igualdad de condiciones experimentales, recogidos en las Figuras III.2.8 (A, B y C), puede destacarse que:

- Los tiempos de análisis requeridos son comparables para las columnas NovaPak® y ABZ+plus. Sin embargo, si que se observan disminuciones importantes para la columna TSK-Gel ODS 80TM, en torno al 50%, cuando se usan HMIm-BF₄ o MOIm-BF₄.
- La disminución más importante en los tiempos de retención tiene lugar para las aminas NH, H, Trp-P-2 y Trp-P-1 en presencia de HMIm-BF₄ o MOIm-BF₄ y para las columnas NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM, siendo mayor para esta última.
- La utilización de BMIm-BF₄ o TEA como supresores de actividad de los silanoles, presenta un comportamiento muy similar en lo que respecta a la retención de las aminas para las tres fases estacionarias estudiadas.

Las Figuras III.2.8 (A, B y C) ponen de manifiesto que la adición de LIs o TEA, como aditivos a la fase móvil, produce no sólo cambios importantes en la retención de las aminas sino en su separación. Puede observarse una buena separación entre todos los compuestos, con la excepción de NH y H que presentan en algunos casos solapamiento total o parcial. Tomando en consideración este par crítico, podemos destacar que ninguna de las fases estacionarias es capaz de resolverlo en presencia de MOIm-BF₄. Mientras tanto, en presencia de BMIm-BF₄ 10 mM, las tres columnas resolvieron con éxito dicho, alcanzándose buenas resoluciones a concentraciones inferiores para las columnas NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM. Las resoluciones de las aminas NH y H con las tres columnas, en presencia de BMIm-BF₄ y HMIm-BF₄, se encuentran en la Tabla III.2.7. Con efectos comparativos, se han incluido las resoluciones obtenidas cuando se utiliza TEA como aditivo en las mismas condiciones experimentales.

Tabla III.2.7. Resoluciones para las aminas NH y H cuando se emplean diferentes aditivos a la fase móvil a una concentración de 10 mM.

Aditivo	NovaPak®	TSK-gel ODS 80™	ABZ+plus
BMIm-BF₄	7.38	7.51	3.36
HMIm-BF₄	3.49	-	2.11
TEA	6.02	5.44	-

(-) Resolución < 1.5

Con el fin de estudiar el efecto de los LIs sobre el perfil de los picos cromatográficos se han determinado anchos y cola de los picos, y se han comparado con los obtenidos en presencia de TEA.

En HPLC una disminución en los tiempos de retención produce una disminución en el ancho de los picos. Para las AHs estudiadas, como se observa en las Figuras III.2.8, cuando se utilizan los LIs como aditivos a la fase móvil, se pueden observar dos comportamientos:

- Para las dos fases estacionarias con una actividad moderada de los grupos silanol residuales (Figuras III.2.8 (A) y (B)), los anchos de los picos disminuyen cuando la concentración de los LIs aumentan desde 0 a 2 mM. Esta disminución es especialmente significativa para las aminas con los tiempos de retención más altos, A α C y MeA α C. A concentraciones superiores de 2 mM, los anchos de pico permanecen prácticamente constantes.
- Por otra parte, para la fase estacionaria ABZ+plus, los anchos de pico aumentan ligeramente al aumentar la concentración de los LIs (Figura III.2.8 (C)). Este comportamiento se debe a que para esta fase estacionaria, a medida que aumentamos la concentración de LI, aumenta la retención de las AHs.

Como se ha comentado, en la separación cromatográfica de compuestos básicos, como es el caso de las AHs, la desviación más frecuente en la simetría de los picos es la presencia de colas en los picos cromatográficos. Estas colas se deben a interacciones con los grupos silanol residuales que se encuentran en la superficie de las fases estacionarias. Si eliminamos la actividad de estos grupos silanol, añadiendo agentes supresores a la fase móvil, podemos disminuir las colas en los picos, mejorando sustancialmente su forma.

La evaluación de la simetría de los picos es importante desde un punto de vista práctico y forma parte de los procedimientos de validación y control de calidad de las

metodologías experimentales de separación. Entre los procedimientos utilizados para el estudio de la simetría de los picos cromatográficos, los más sencillos son los de tipo gráfico o de cálculo. Estos procedimientos consisten en el cálculo de los factores de asimetría y factores de cola, respectivamente.

En nuestro caso hemos empleado el factor de cola, calculado de acuerdo con la siguiente expresión:

$$F_c = 0.5 \cdot \left(\frac{t_b - t_a}{t_R - t_a} \right)$$

donde t_R es el tiempo de retención, y t_a y t_b son los tiempos en los frentes y colas de los picos para una altura del 5% de la altura total. Atendiendo a la expresión utilizada para el cálculo de los factores de cola, para que un pico sea simétrico, es decir, $F_c = 1$, la diferencia ($t_b - t_a$) debe ser el doble que ($t_R - t_a$).

A partir de los resultados obtenidos para los factores de cola de las aminas estudiadas en las tres fases estacionarias, y con los tres líquidos iónicos, se pueden destacar dos comportamientos. Por una parte, en las columnas con una actividad moderada de los grupos silanol residuales, al aumentar la concentración de LI, las colas de los picos disminuyen ligeramente. Esto puede deberse a que un aumento en la concentración de supresor en la fase móvil, produce una disminución en la retención de los analitos, por lo que sus picos cromatográficos son más estrechos y están mejor definidos. Para la columna ABZ+plus con una actividad baja de los grupos silanol, los factores de cola permanecen prácticamente constantes o con ligeros aumentos al aumentar la concentración de aditivo. Este comportamiento con respecto a las colas de los picos es el esperado en este tipo de fases estacionarias que contienen grupos silanol enlazados.

En la Figura III.2.9 se muestran los factores de cola para una concentración 10 mM de aditivo. También se han incluido los valores obtenidos para el factor de cola en ausencia de aditivo.

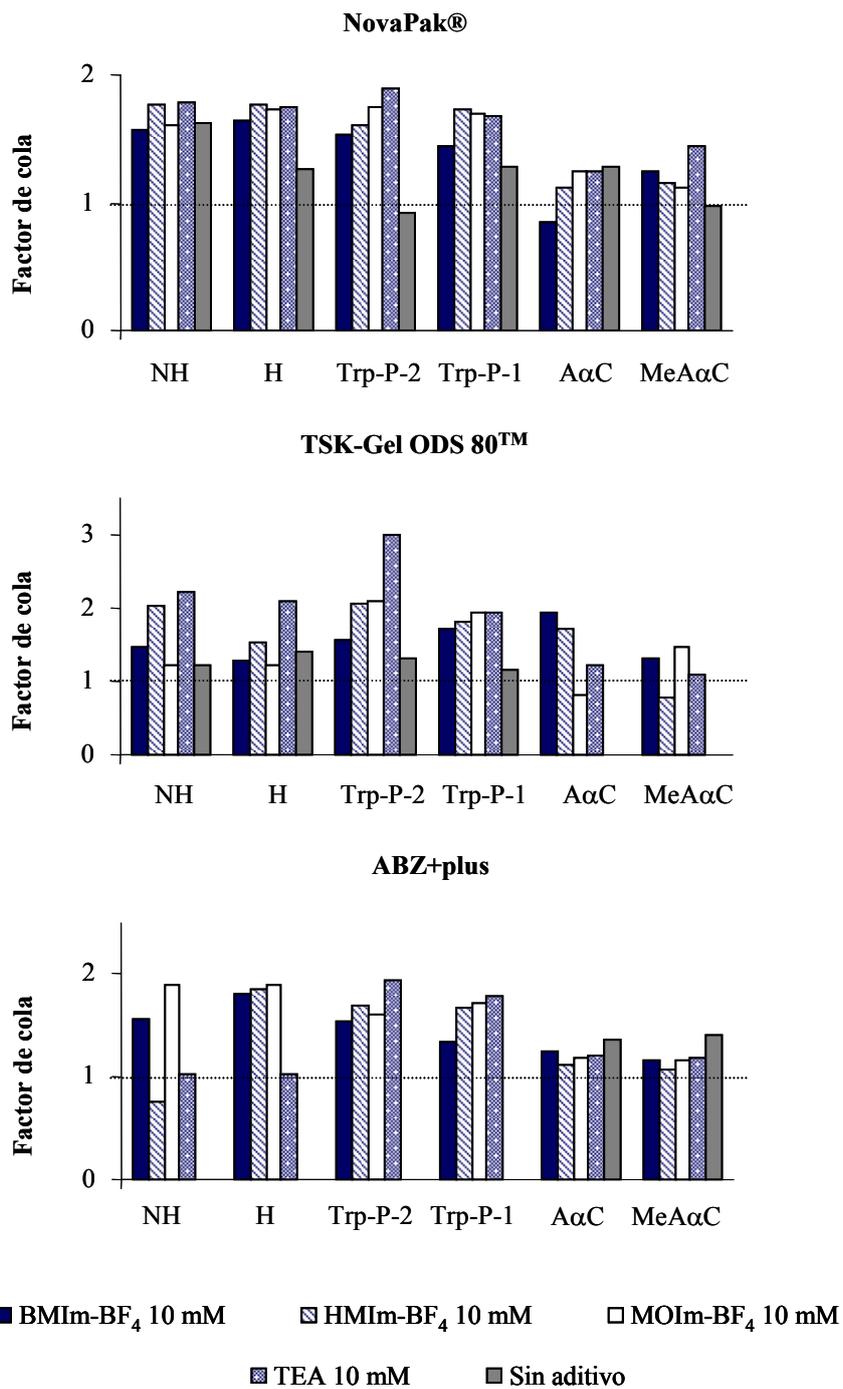


Figura III.2.9. Factores de cola obtenidos para las AHs en las tres fases estacionarias en ausencia de aditivo y cuando se emplean los LIs y la TEA como aditivos a la fase móvil.

En la Figura anterior puede observarse que, para las dos fases estacionarias con una actividad moderada de los grupos silanol, cuando se añade cualquier aditivo a la fase móvil, las colas de pico son superiores a las obtenidas en ausencia de aditivo, excepto para A α C en la columna NovaPak®. Realmente, lo que sucede es que en ausencia de aditivo, los tiempos de retención son tan grandes que los picos son muy anchos y con poca altura, y este hecho no queda recogido matemáticamente a la hora de calcular los factores de cola. De cualquier forma, las diferencias encontradas entre los factores de cola obtenidos en presencia o ausencia de aditivo son pequeñas con algunas excepciones, como puede observarse en la Figura III.2.9.

Por otra parte, y debido a la propia naturaleza de la fase estacionaria, la columna ABZ+plus presenta un comportamiento opuesto. En ausencia de aditivo, las cuatro primeras aminas (NH, H, Trp-P-2 y Trp-P-1) se eluyen en un único pico, por lo que no se puede estudiar su factor de cola en estas condiciones. Para las aminas A α C y MeA α C, la presencia de cualquier aditivo hace disminuir el factor de cola.

En general, salvo algunas excepciones, como NH, H y Trp-P-2 con TEA en la columna TSK-Gel ODS 80TM o NH con MOIm-BF₄ y BMIm-BF₄ en la columna ABZ+plus, la naturaleza del aditivo no tiene una gran influencia en el factor de cola, aunque se puede concluir que, en general, los factores de cola obtenidos con 10 mM de LIs son ligeramente inferiores a los obtenidos en presencia de 10 mM de TEA.

Cuando se comparan los cromatogramas obtenidos al emplear los LIs como aditivos a la fase móvil con los obtenidos al emplear TEA, se pueden establecer algunas conclusiones:

- La conjunción de la disminución de los tiempos de retención y las mejoras en las colas de los picos hacen que los cromatogramas obtenidos con los LIs presenten picos más estrechos y mejor definidos que cuando empleamos TEA como aditivo. Estas mejoras se producen en las fases estacionarias que presentan una actividad moderada de los grupos silanol residuales y contribuyen a obtener mejores resoluciones cromatográficas.
- BMIm-BF₄ 1 mM como aditivo a la fase móvil resultó ser la mejor condición con respecto a los tiempos de retención y formas de los picos, ya que concentraciones superiores de LI disminuyen excesivamente los tiempos de retención de los analitos y se producen solapamientos entre algunos picos (NH y H), tal y como puede verse en las Figuras III.2.8.

Efecto de los LIs en la altura y área de los picos cromatográficos

Las áreas y las alturas de los picos están relacionadas tanto con aspectos cromatográficos como con aspectos referentes a la detección. En ese sentido, a la hora de estudiar el efecto de los LIs en el área y altura de pico, parámetros que determinan la sensibilidad de los métodos cromatográficos, se debe tener en cuenta el sistema de detección utilizado. Las Figuras III.2.10 (A, B y C) muestran la variación de las alturas de pico en función de la concentración de los LIs para las AHs en las tres fases estacionarias estudiadas.

En el apartado III.2.1, que describe el comportamiento óptico de las AHs en presencia de los LIs, se puso de manifiesto que éstos no afectan a los espectros de absorción de las aminas a las longitudes de onda de trabajo, en cambio, sí que producen aumentos en la intensidad de fluorescencia emitida para algunas de las aminas. Por tanto, las variaciones observadas en las alturas y áreas de los picos cromatográficos, cuando se usa detección Vis-UV, deben venir determinadas por el carácter supresor de los grupos silanol de los LIs que dan lugar a una menor retención de los analitos, y como consecuencia, picos más estrechos y mejor definidos. Por el contrario, cuando se usa detección fluorescente debe considerarse conjuntamente el carácter supresor de los LIs y el efecto que éstos producen en la intensidad de fluorescencia emitida por las AHs.

En el caso de las columnas NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM, el LI MOIm-BF₄ debe dar lugar a las mayores alturas de pico, ya que, como se ha comentado anteriormente, este aditivo produce la retención más baja de las aminas. De la misma manera, las menores alturas deben encontrarse para el BMIm-BF₄. Este es el comportamiento que cabría esperar si sólo tuviéramos en cuenta el carácter supresor de estos aditivos. Sin embargo, estos LIs presentan la capacidad de incrementar la fluorescencia de algunas aminas. Las Figuras III.2.10 (A y B), muestran que todas las aminas siguen el comportamiento esperado cuando se utiliza detección Vis-UV. Sin embargo, con detección fluorescente, salvo algunas excepciones, el LI que da lugar a las mayores alturas de pico es el BMIm-BF₄. En este caso, el incremento de la fluorescencia producido por este LI es mayor que la influencia en la separación cromatográfica del MOIm-BF₄. Para las aminas Trp-P-2 y Trp-P-1 este efecto es más importante, ya que estas aminas presentan los mayores incrementos de fluorescencia en presencia de BMIm-BF₄.

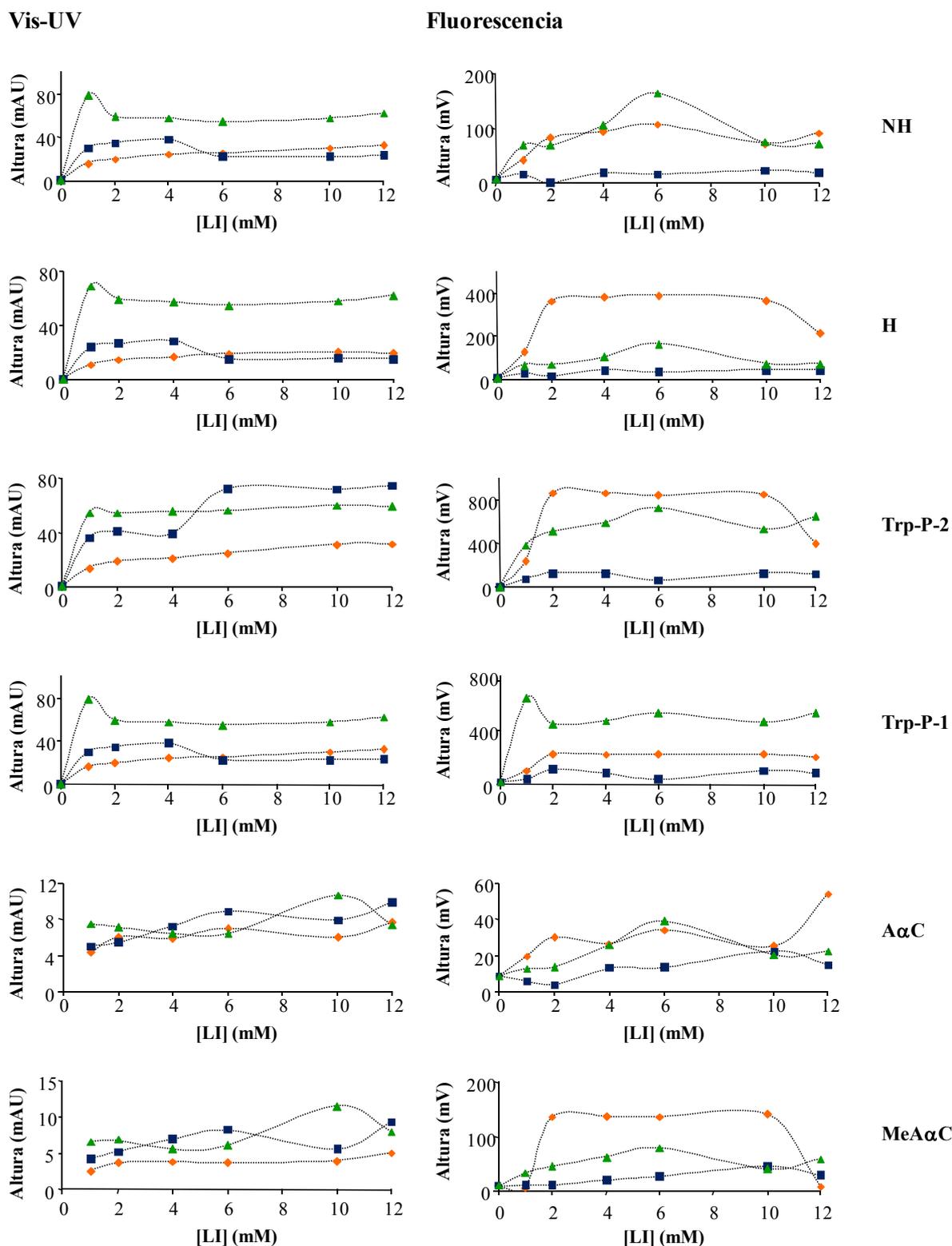


Figura III.2.10 (A). Alturas de pico para las aminas con los tres LIs en la fase estacionaria NovaPak® con detección Vis-UV y fluorescente. LIs: (◆) BMIm-BF₄, (■) HMIm-BF₄ y (▲) MOIm-BF₄.

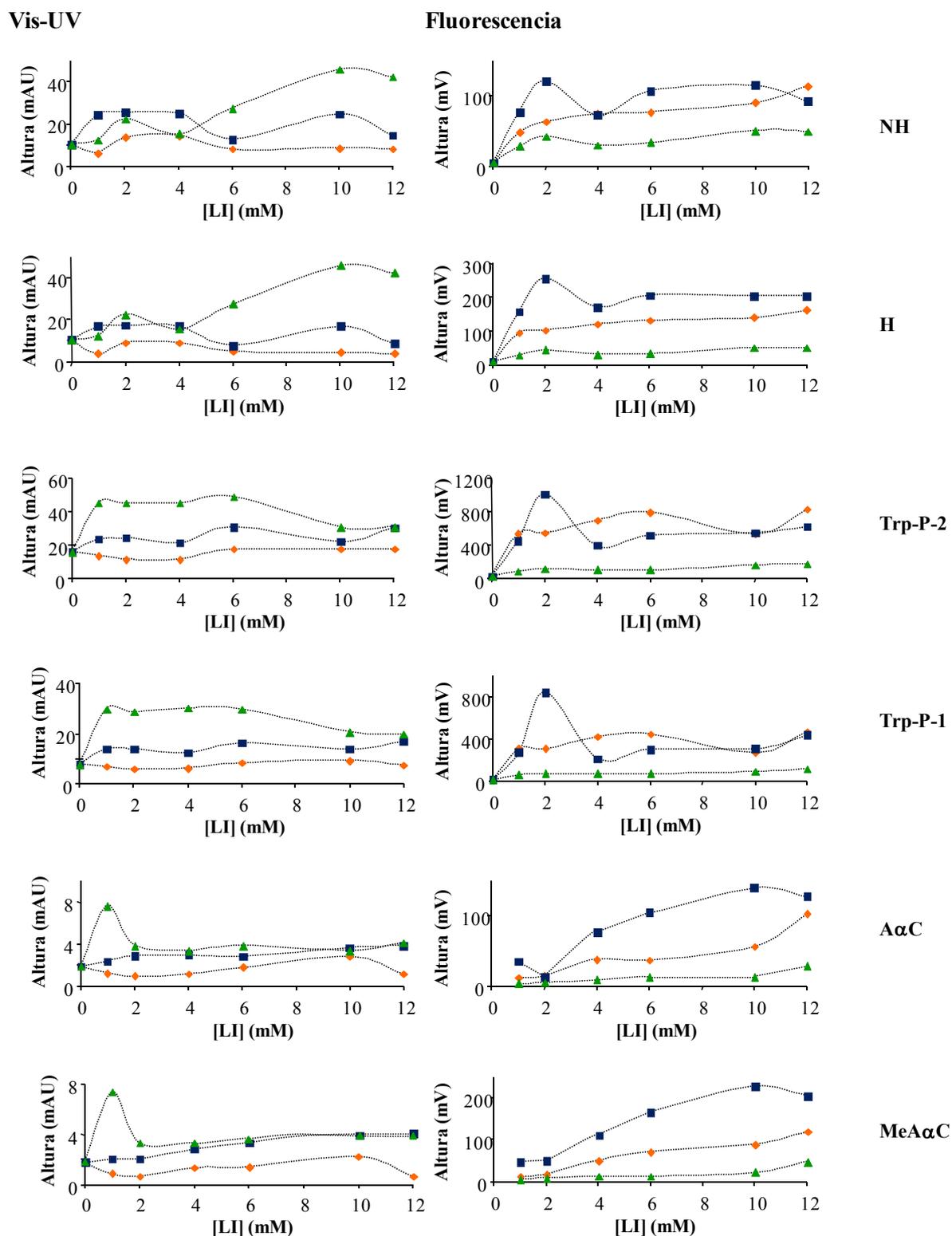


Figura III.2.10 (B). Alturas de pico para las aminas con los tres LIs en la fase estacionaria TSK-Gel ODS 80TM con detección Vis-UV y fluorescente. LIs: (♦) BMIm-BF₄, (■) HMIIm-BF₄ y (▲) MOIm-BF₄.

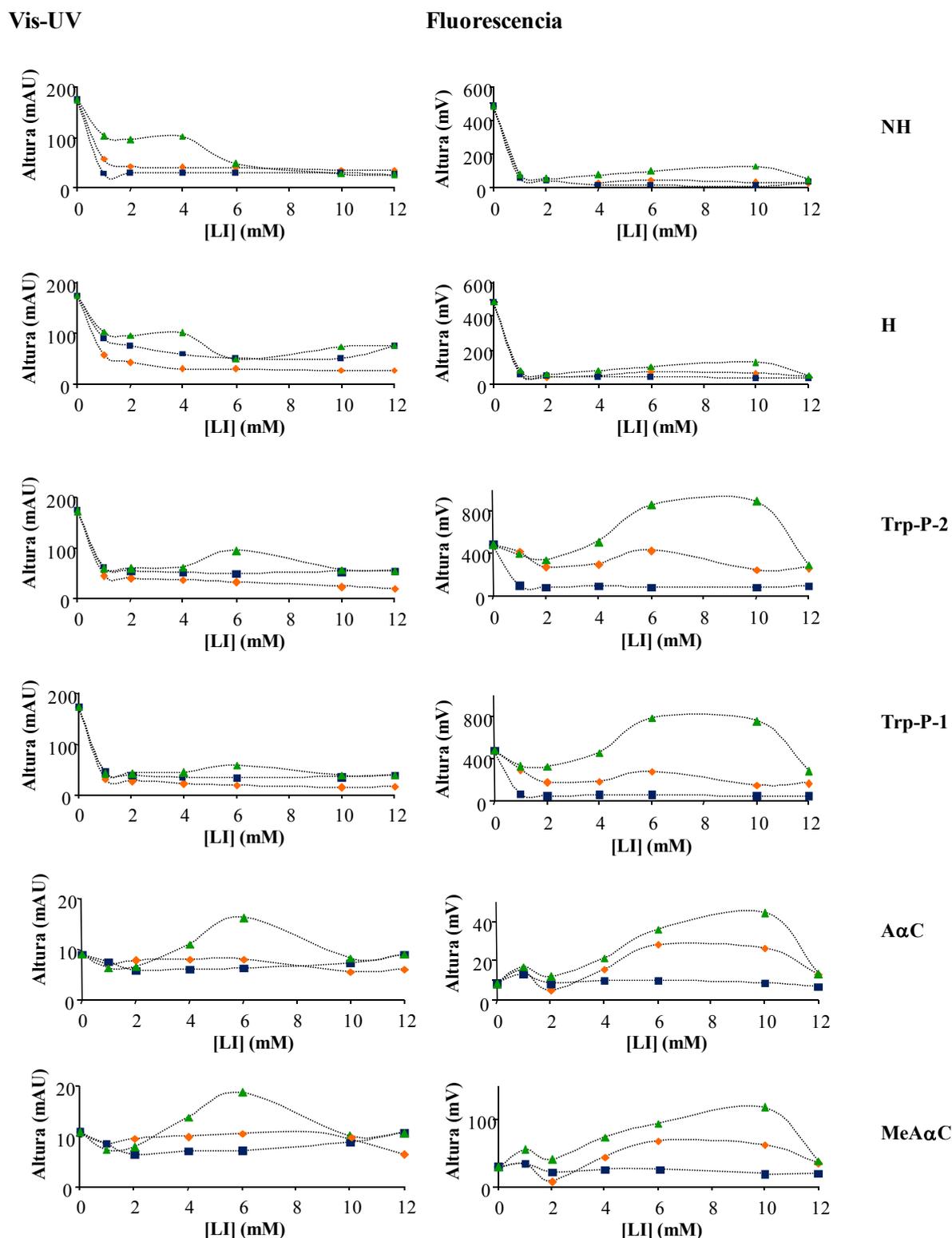


Figura III.2.10 (C). Alturas de pico para las aminas con los tres LIs en la fase estacionaria ABZ+plus con detección Vis-UV y fluorescente. LIs: (◆) BMIm-BF₄, (■) HMIm-BF₄ y (▲) MOIm-BF₄.

Para la columna ABZ+plus, Figura III.2.10 (C), lo que debe destacar es el factor cromatográfico, ya que, como hemos comentado, la adición de LIs a la fase móvil, provoca un aumento notable de los tiempos de retención, por lo que disminuyen las alturas de los picos. Cuando se emplea detección fluorescente, las aminas Trp-P-2 y Trp-P-1 presentan un comportamiento diferenciado concordante con lo comentado anteriormente para las dos fases estacionarias con actividad moderada de los grupos silanol residuales.

En general, para las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM, la altura de los picos aumenta cuando lo hace la concentración de LI. En cambio, la columna ABZ+plus, debido a la característica de que los grupos silanol están, en su mayoría, enlazados con grupos amida, presenta un comportamiento particular, a medida que aumenta la concentración de aditivo, aumenta la retención de los analitos y, por lo tanto, disminuye la altura de los picos cromatográficos.

Por último se ha estudiado el efecto que produce la presencia de los LIs como aditivos a la fase móvil en las áreas de los picos. En la Figura III.2.11 se muestran las áreas de pico (en %) obtenidas cuando se emplea una concentración de 10 mM de los LIs o TEA.

Puede observarse que cuando se emplea la detección Vis-UV, para las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM, las áreas de pico obtenidas para los distintos LIs son similares, excepto para MeAαC, NH y H cuando se emplea MOIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil. Estas dos últimas aminas no pueden resolverse cromatográficamente, por lo que el área indicada en la Figura III.2.11 es el área correspondiente a las dos aminas.

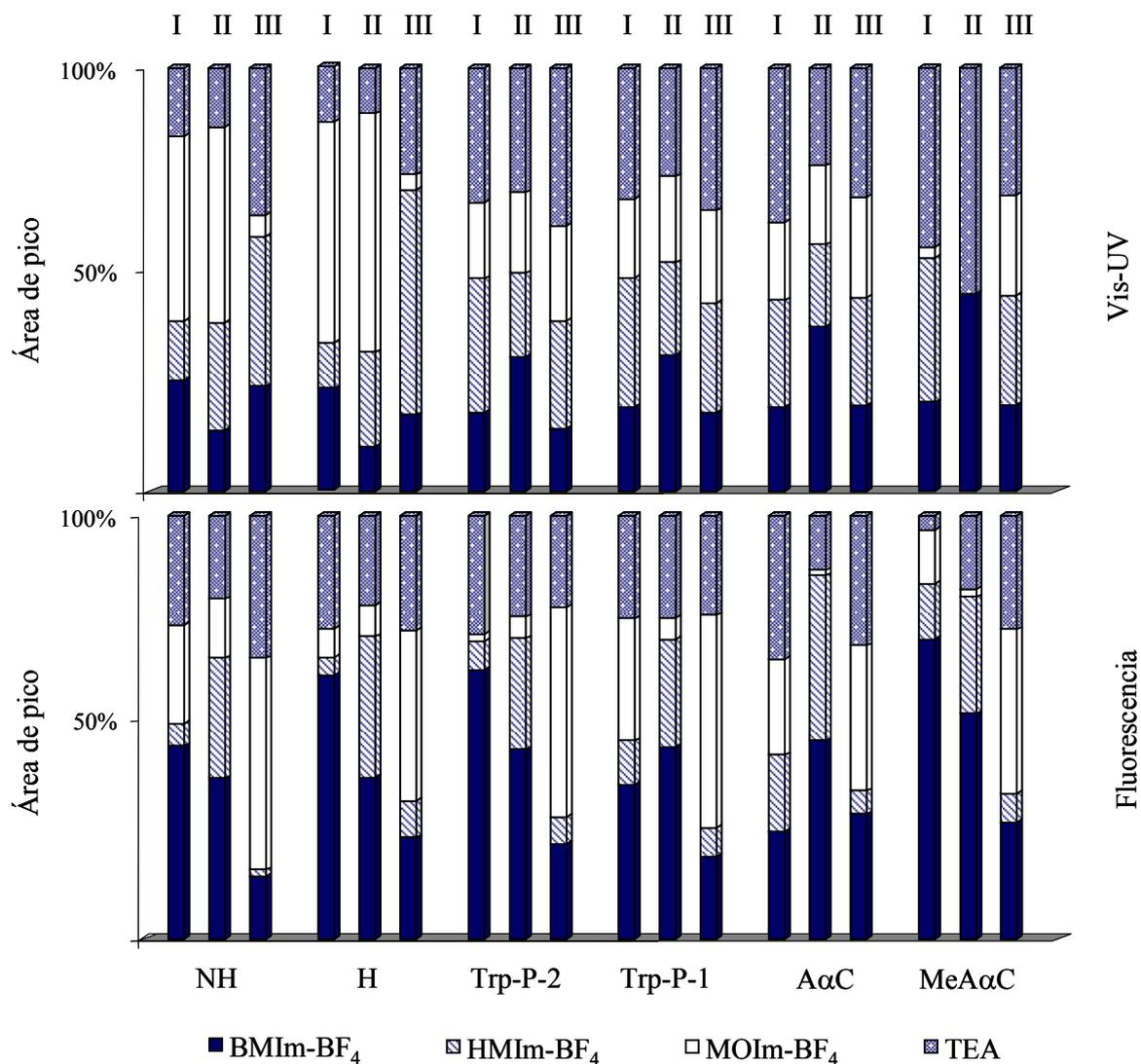


Figura III.2.11. Áreas de pico (%) para las aminas y las tres fases estacionarias estudiadas con detección Vis-UV y fluorescencia. Columnas: I = NovaPak®, II = TSK-Gel ODS 80TM y III = ABZ+plus.

Por otra parte, cuando se emplea la detección fluorescente se debe tener en cuenta que la presencia de BMIm-BF₄ hace que aumente la fluorescencia emitida por algunas aminas, resultando, por tanto, áreas de pico superiores a las que se obtienen para los otros aditivos. Este efecto queda reflejado en la Figura III.2.11 para las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM. En el caso de la fase estacionaria ABZ+plus, las mayores áreas de pico se obtienen cuando se emplea MOIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil, efecto ya comentado al estudiar la variación de las alturas de los picos cromatográficos en presencia de los LIs.

Efecto de los LIs en la eficacia

El cambio en las eficacias de las fases estacionarias estudiadas para las AHs, en presencia de los LIs como aditivos a la fase móvil, se expresó como la relación entre el número de platos teóricos medido en presencia del aditivo y el número de platos teóricos obtenido en ausencia de aditivo (N/N_0). El número de platos teóricos viene definido por la siguiente expresión:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

donde t_R y w son el tiempo de retención y el ancho de pico cromatográfico de un analito, respectivamente.

La Figura III.2.12 muestra los resultados obtenidos en el cambio en las eficacias (N/N_0) de las tres fases estacionarias estudiadas cuando se emplea una concentración de 10 mM de BMIm-BF₄, HMIm-BF₄, MOIm-BF₄ o TEA como aditivos a la fase móvil y con detección fluorescente.

Si consideramos las fases estacionarias NovaPak® y TSK-Gel ODS 80TM, para todas las aminas, excepto para A α C, se aprecia un comportamiento similar, las mayores eficacias se obtienen cuando se emplean los LIs BMIm-BF₄ y HMIm-BF₄ como aditivos a la fase móvil. Aunque el comportamiento es similar, se obtienen eficacias ligeramente superiores para la fase estacionaria TSK-Gel ODS 80TM. Para esta columna no se han incluido las eficacias para las aminas A α C y MeA α C, dado que estas aminas presentan tiempos de retención superiores a 240 minutos en ausencia de aditivo (ver Figura III.2.8 (B)), encontrándose fuera del dominio experimental.

En la columna ABZ+plus, para las cuatro primeras aminas, se produce un gran aumento en la eficacia al añadir cualquier aditivo (LIs o TEA) a la fase móvil, siendo este aumento especialmente significativo, cuando se emplea BMIm-BF₄ como aditivo. En el caso de las aminas menos polares, A α C y MeA α C, no se producen aumentos significativos en las eficacias en presencia de ninguno de los aditivos estudiados.

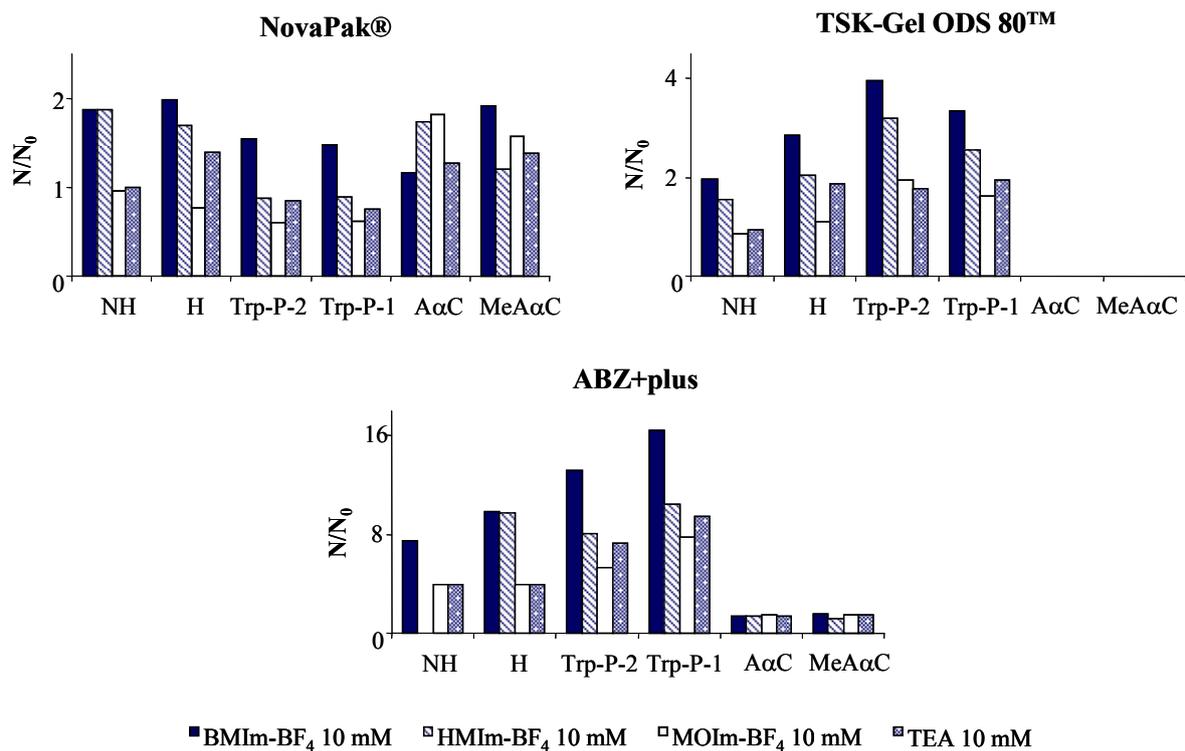


Figura III.2.12. Cambio en la eficacia expresado como la relación entre el número de platos medido en presencia, N, y ausencia de aditivo, N₀.

III.2.4 Características analíticas de los métodos cromatográficos con la utilización de LIs como aditivos a la fase móvil

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores permiten establecer las condiciones óptimas para la separación de AHs usando LIs como aditivos a la fase móvil: 1 mM BMIm-BF₄ y la columna NovaPak®. Bajo estas condiciones y con un pH=3.6 y 18% (v/v) de acetonitrilo en la fase móvil, se determinaron los parámetros de calidad del método cromatográfico que se recogen en la Tabla III.2.8 usando detección Vis-UV o fluorescente.

Como se ha venido comentando, cuando se emplean los LIs como aditivos a la fase móvil, éstos mejoran las áreas de los picos, la línea base y disminuyen los tiempos de retención y las colas de los picos, entre otros aspectos. Estos efectos beneficiosos permiten utilizar rangos dinámicos entre 0.0025 y 0.966 µg mL⁻¹ con detección Vis-UV y entre 0.0017 y 0.289 ng mL⁻¹ con detección fluorescente. Estos rangos dinámicos, con coeficientes de

correlación (R) superiores a 0.984 en todos los casos, son comparables con los obtenidos por otros autores [172], incluso cuando se emplea el detector de espectrometría de masas [179].

Como puede observarse en la Tabla III.2.8, las pendientes obtenidas con la detección fluorescente son, al menos, 10 veces mayores que las que se obtienen con detección Vis-UV. En el caso de la amina Trp-P-2, la pendiente obtenida con detección fluorescente es 35 veces superior a la obtenida con detección Vis-UV.

La precisión de los métodos, expresada como desviación estándar relativa (RSD), se calculó en los niveles de concentración que se indican en la Tabla III.2.8. El rango de RSD (%) está comprendido entre 3.2 y 6.6% con detección Vis-UV y 0.65 y 5.2% con detección fluorescente. Es de destacar que los valores de RSD obtenidos son comparables a los que se obtienen con detección Vis-UV, aunque los niveles de concentración son 10^3 veces inferiores.

La mayor ventaja que se obtiene en el método cromatográfico cuando los LIs se utilizan como aditivos a la fase móvil, se encuentra en los límites de detección (LD). Los LD se calcularon como tres veces la relación señal-ruido y están comprendidos entre $0.001 \mu\text{g mL}^{-1}$ para H y $0.147 \mu\text{g mL}^{-1}$ para Trp-P-1 con la detección Vis-UV, y entre 0.001ng mL^{-1} para NH y 0.006ng mL^{-1} para A α C con detección fluorescente. Límites de detección comparables o inferiores con los obtenidos por otros autores utilizando metodologías más complejas, como SPME con fibras huecas con 1-octanol y analizadas posteriormente mediante HPLC-UV ($0.1 - 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$) [180] o SPME-HPLC-MS ($1.8 - 7.4 \text{ng L}^{-1}$) [149].

Como conclusión, el uso de BMIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil en HPLC en conjunción con una técnica de detección sensible, como es la fluorescencia, permitiría alcanzar niveles de ng g^{-1} , necesarios para la determinación de AHs en muestras de alimentos sin etapas de preconcentración.

Tabla III.2.8. Parámetros de calidad del método analítico con detección Vis-UV y detección fluorescente.

Detección Vis-UV					
Compuesto	Rango dinámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(Pendiente \pm SD) $\times 10^{-6}$	RSD (%) ^a	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
NH	0.038 – 0.966	0.98 \pm 0.07	3.80 (0.362)	0.031	
H	0.0025 – 0.368	2.78 \pm 0.04	4.54 (0.122)	0.001	
Trp-P-2	0.026 – 0.295	9.1 \pm 0.4	3.98 (0.111)	0.024	
Trp-P-1	0.148 – 0.932	6.2 \pm 0.4	6.34 (0.349)	0.147	
A α C	0.157 – 0.920	0.12 \pm 0.01	6.60 (0.345)	0.024	
MeA α C	0.019 – 0.389	4.3 \pm 0.3	3.19 (0.146)	0.009	
Detección fluorescente					
Compuesto	Rango dinámico (ng mL^{-1})	(Pendiente \pm SD) $\times 10^{-7}$	RSD (%) ^a	LD (ng mL^{-1})	
NH	0.0028 – 0.289	0.63 \pm 0.06	2.64 (0.097)	0.001	
H	0.004 – 0.098	6.6 \pm 0.4	2.27 (0.033)	0.003	
Trp-P-2	0.0017 – 0.044	31 \pm 10	2.56 (0.029)	0.001	
Trp-P-1	0.0034 – 0.093	19 \pm 6	3.17 (0.093)	0.003	
A α C	0.018 – 0.276	0.16 \pm 0.03	5.20 (0.092)	0.006	
MeA α C	0.0021 – 0.117	4.7 \pm 0.5	0.65 (0.039)	0.002	

^aDesviación estándar relativa (n=5) Los valores entre paréntesis son los niveles de concentración empleados ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ng mL^{-1} con detección Vis-UV y fluorescente, respectivamente)

III.3 Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de AHs mediante HPLC con detección Electroquímica

En el apartado anterior se han estudiado los efectos de tres LIs de la familia del alquilimidazolio en la separación cromatográfica de seis AHs en tres fases estacionarias haciendo uso de detección Vis-UV y fluorescente. Asimismo, se estudiaron las características fluorescentes y de absorción en el Vis-UV de estas AHs en presencia de los LIs y de los propios LIs, observándose que al añadir LIs como aditivos a la fase móvil éstos pueden ser o no transparentes al sistema de detección utilizado, favoreciendo o perjudicando la propia detección de los analitos.

Hasta la fecha, todas las aplicaciones descritas en la bibliografía en relación al uso de los LIs como aditivos a la fase móvil en HPLC usan detección Vis-UV o DAD [149, 152, 153, 164], no encontrándose referencias sobre el empleo de la detección electroquímica.

Como se ha descrito en el Capítulo anterior, las aminas heterocíclicas presentan, en general, un buen comportamiento electroquímico debido a la presencia de su grupo amino, por lo que la detección electroquímica ha sido aplicada con éxito a la determinación de estos compuestos por HPLC. Por otra parte, los LIs presentan, entre sus propiedades características, una buena estabilidad electroquímica y una movilidad iónica elevada, lo que les convierte en óptimos candidatos como aditivos a la fase móvil en HPLC con detección electroquímica.

III.3.1 Influencia de los LIs en la respuesta del detector electroquímico. Curvas intensidad-potencial

La detección electroquímica no se basa en el empleo de alguna propiedad física de los analitos, sino en la medida de la corriente resultante de la reducción u oxidación de las moléculas de analito en la superficie de un electrodo situado en una celda de flujo sobre el que se ha aplicado un determinado potencial. La corriente resultante de la electrolisis de un analito depende de muchos factores, entre los cuales se encuentra la composición de la fase móvil.

Tal y como hemos venido comentado, en la separación de las AHs mediante cromatografía líquida en fase inversa es necesaria la presencia, en la fase móvil, de un agente bloqueante de los grupos silanol residuales, siendo la trietilamina (TEA) uno de los compuestos más frecuentemente utilizados. Sin embargo, la TEA es electroquímicamente activa, lo que impide su uso como agente bloqueante de los grupos silanol cuando se utiliza detección electroquímica.

En el apartado III.2 se ha puesto de manifiesto los beneficiosos efectos de tres LIs de la familia del alquilimidazolio como agentes bloqueantes para tres fases estacionarias con baja o moderada actividad de los grupos silanol.

El uso de los LIs como aditivos a la fase móvil cambia las características iónicas de la misma, y por lo tanto, este aspecto debe ser investigado en conjunción con la detección electroquímica.

Para llevar a cabo este estudio, se han realizado curvas intensidad-potencial de fases móviles conteniendo un 18% de acetonitrilo y 1 mM de cada uno de los LIs (pH = 3.6) o 50 mM de acetato amónico (pH = 6), así como fases móviles que contenían estos aditivos pero libres de acetonitrilo. Estas composiciones se han elegido atendiendo, en primer lugar, a los resultados obtenidos en el apartado anterior, es decir, los mejores resultados se obtienen cuando se añaden pequeñas concentraciones de LIs a la fase móvil. En segundo lugar, la concentración de 50 mM de acetato amónico es la que normalmente se emplea para las determinaciones de AHs mediante HPLC con detección electroquímica [181, 133]. También se utilizaron fases móviles libres de aditivos, con y sin acetonitrilo, con el objeto de comparar el efecto de los diferentes aditivos en la corriente residual.

En la Figura III.3.1 se muestran las curvas de intensidad-potencial obtenidas cuando se varía el potencial aplicado entre 0 y +1200 mV. Puede observarse que:

- Todas las fases móviles que contienen LIs producen corrientes de fondo similares, inferiores a 60 nA, al variar el potencial aplicado entre 0 y +800 mV. Para potenciales aplicados superiores a +900 mV las corrientes aumentan bruscamente.
- Para potenciales aplicados de +1000 mV, potencial de trabajo que normalmente se emplea en la detección electroquímica de las AHs [182], las fases móviles que contienen LIs muestran corrientes de fondo unas tres veces inferiores a las obtenidas en presencia de acetato amónico 50 mM.

- La presencia de acetonitrilo como modificador orgánico no ejerce influencia alguna en la respuesta del detector.

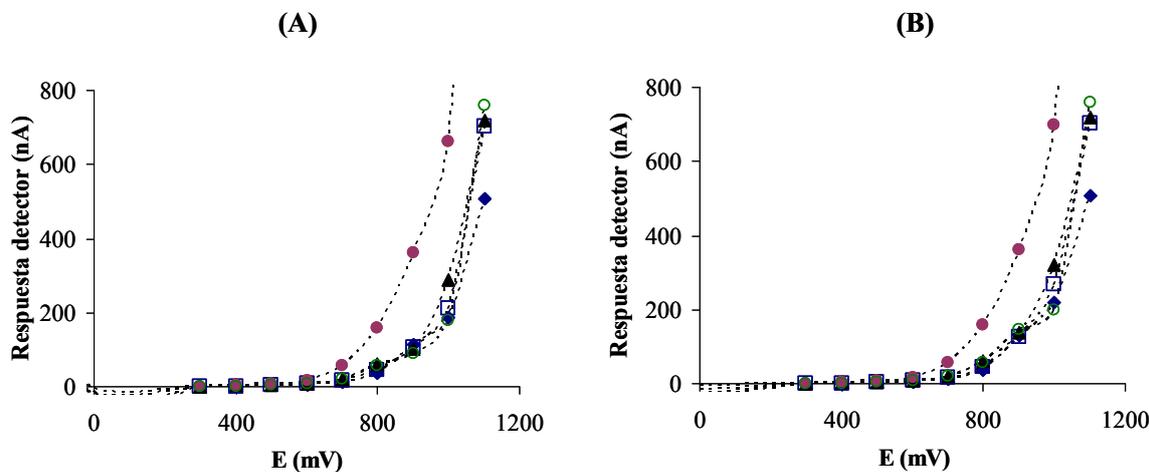


Figura III.3.1. Ventana de potencial de detector electroquímico cuando se emplean las fases móviles (A) con 18% v/v de acetonitrilo o (B) libre de acetonitrilo, compuestas por (◆) 1 mM BMIm-BF₄, (□) 1 mM HMIIm-BF₄, (▲) 1 mM MOIm-BF₄, (●) 50 mM acetato amónico, y (○) sin aditivos (ni LIs ni acetato amónico).

Los bajos valores de las corrientes de fondo para las fases móviles que contienen LIs debe conducir a cromatogramas con menos ruido y una línea base más limpia. Por lo tanto, es de esperar que los límites de detección obtenidos, cuando se utilicen LIs como aditivos a la fase móvil, sean inferiores a los que se obtienen cuando se utiliza acetato amónico.

III.3.2 Efecto de los LIs en los factores de retención, área, altura y ancho de pico

Para estudiar el efecto de los LIs cuando se emplean como aditivos a la fase móvil con detección electroquímica, se utilizó el modo de elución isocrático. Este es el modo normalmente empleado para la determinación de AHs con detección electroquímica [181, 183], y ha sido el usado en el apartado anterior al estudiar los efectos de estos LIs como aditivos a la fase móvil con detección Vis-UV y fluorescente. A lo largo de este estudio se utilizó una fase móvil preparada tal y como se indica en el apartado IV.3.2 de la Parte Experimental, las cuales, independientemente de la presencia o naturaleza de los aditivos (LIs

o acetato amónico), contienen un 18% (v/v) de acetonitrilo como modificador orgánico y 0.05 M EDTA y 2 mM KCl, necesarios para el correcto funcionamiento del detector electroquímico.

En las Figuras III.3.2 (A, B y C) se muestran los cromatogramas obtenidos cuando se emplean los tres LIs como aditivos a la fase móvil, para las tres fases estacionarias consideradas. Además se han incluido, a efectos comparativos, los cromatogramas obtenidos con estas fases estacionarias en ausencia de aditivo y en presencia de acetato amónico 50 mM en la fase móvil. Como era de esperar, la adición de LIs a la fase móvil, independientemente de la fase estacionaria utilizada y de la naturaleza del LI utilizado, conduce a una disminución importante en los tiempos de retención y cromatogramas con menor ruido de fondo y líneas base más estables que los obtenidos en ausencia de aditivo o en presencia de acetato amónico.

Los parámetros cromatográficos que se han seleccionado para estudiar la influencia de los LIs como aditivos a la fase móvil son: el factor de retención, el área, la altura y el ancho de los picos de las AHs.

La retención en cromatografía líquida se mide normalmente mediante el factor de retención, k , que se define como:

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

donde t_R es el tiempo de retención del analito de interés y t_0 es el tiempo muerto, es decir, el tiempo que requiere un compuesto ideal no retenido para recorrer la distancia entre el inyector y el detector, cuando se eluye a flujo constante.

Para calcular los factores de retención de las AHs es necesario conocer el tiempo muerto del sistema. Debido a su simplicidad práctica, para determinar el tiempo muerto es común la inyección de marcadores, es decir, compuestos idealmente no retenidos. En nuestro caso hemos empleado metanol como marcador para las tres columnas estudiadas, ya que independientemente de la fase móvil que estemos estudiando (con o sin aditivos) esta sustancia no sufre retención. El tiempo muerto depende, no sólo del sistema cromatográfico propiamente dicho (inyector, bombas, conducciones, etc.), sino de la naturaleza de la fase estacionaria. Así, los t_0 calculados son 1.22 minutos para la fase estacionaria NovaPak®, 1.25 minutos para la TSK-gel ODS 80TM y, por último, 0.50 minutos para la columna ABZ+plus.

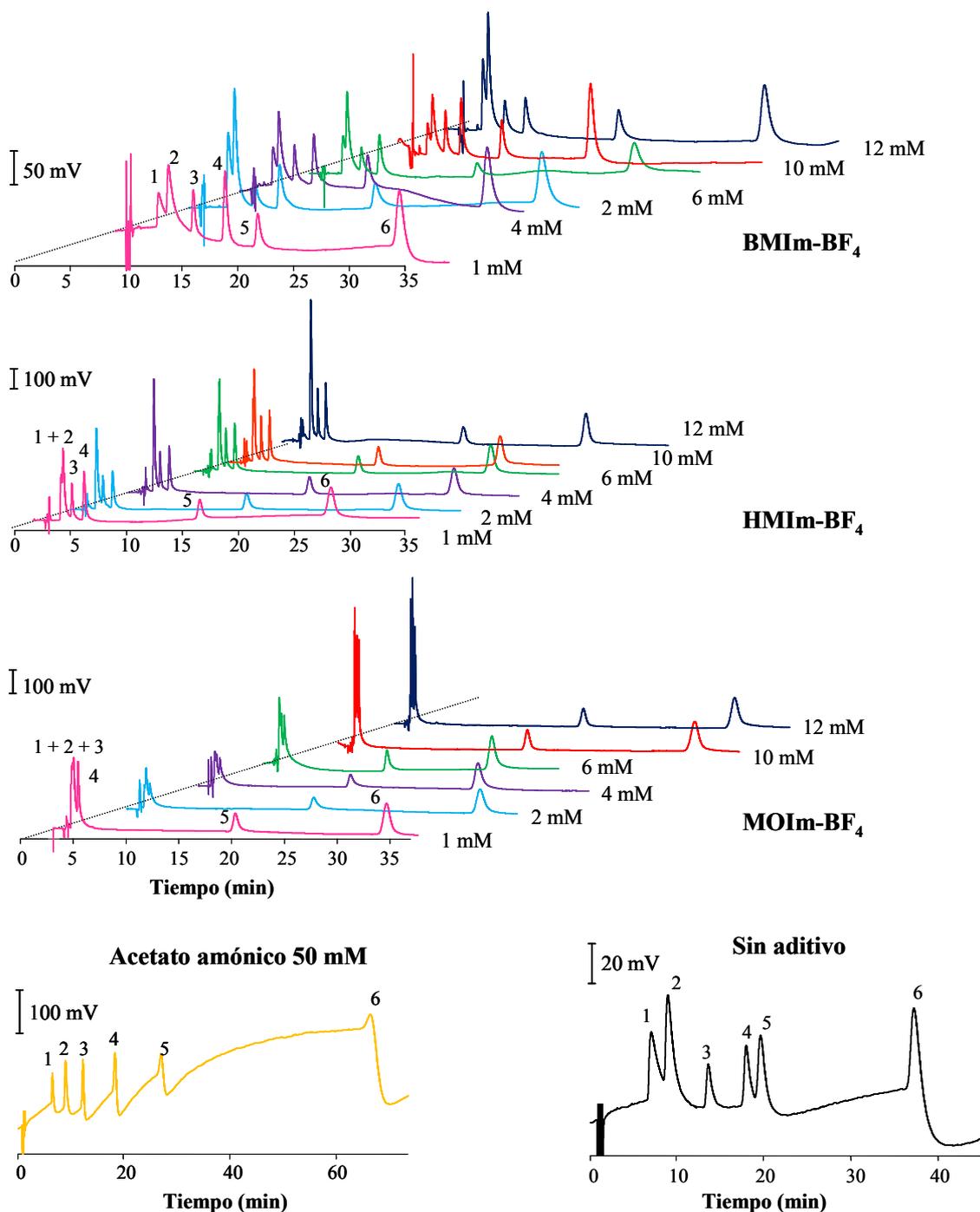


Figura III.3.2 (A). Cromatogramas de las AHs utilizando diferentes concentraciones de LIs, acetato amónico 50 mM y sin aditivo en la fase móvil con la columna NovaPak® y detección electroquímica. Orden de elución de las aminos y su concentración: (1) NH ($1.45 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) H ($0.490 \mu\text{g mL}^{-1}$), (3) Trp-P-2 ($0.443 \mu\text{g mL}^{-1}$), (4) Trp-P-1 ($1.40 \mu\text{g mL}^{-1}$), (5) A α C ($4.92 \mu\text{g mL}^{-1}$), y (6) MeA α C ($0.583 \mu\text{g mL}^{-1}$). El contenido de acetonitrilo es del 18% (v/v) en todos los casos.

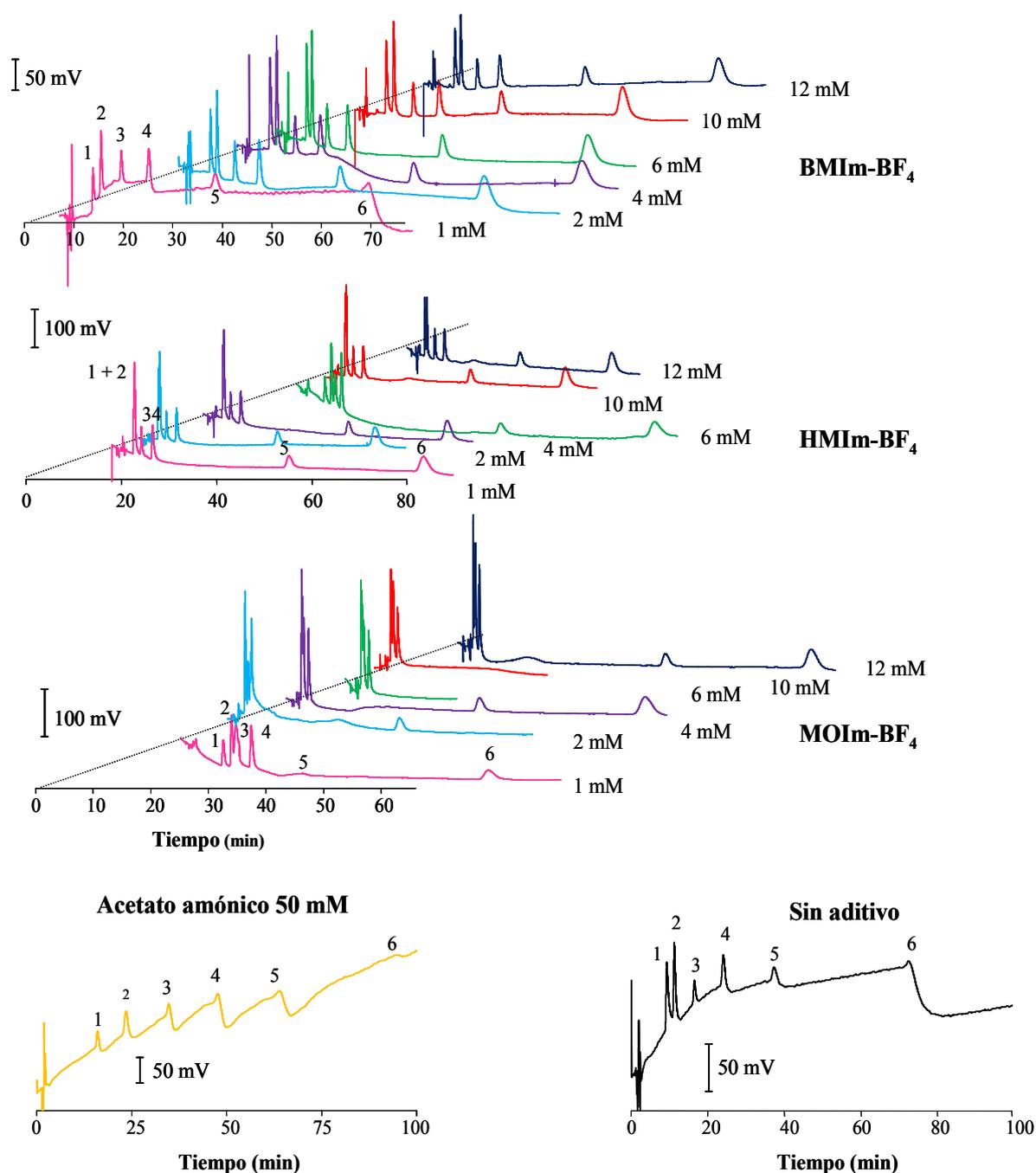


Figura III.3.2 (B). Cromatogramas de las AHs utilizando diferentes concentraciones de LIs, acetato amónico 50 mM y sin aditivo en la fase móvil con la columna TSK-gel ODS 80TM y detección electroquímica. Orden de elución de las aminos y su concentración: (1) NH (1.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (2) H (0.490 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (3) Trp-P-2 (0.443 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (4) Trp-P-1 (1.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (5) A α C (4.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y (6) MeA α C (0.583 $\mu\text{g mL}^{-1}$). El contenido de acetonitrilo es del 18% (v/v) en todos los casos.

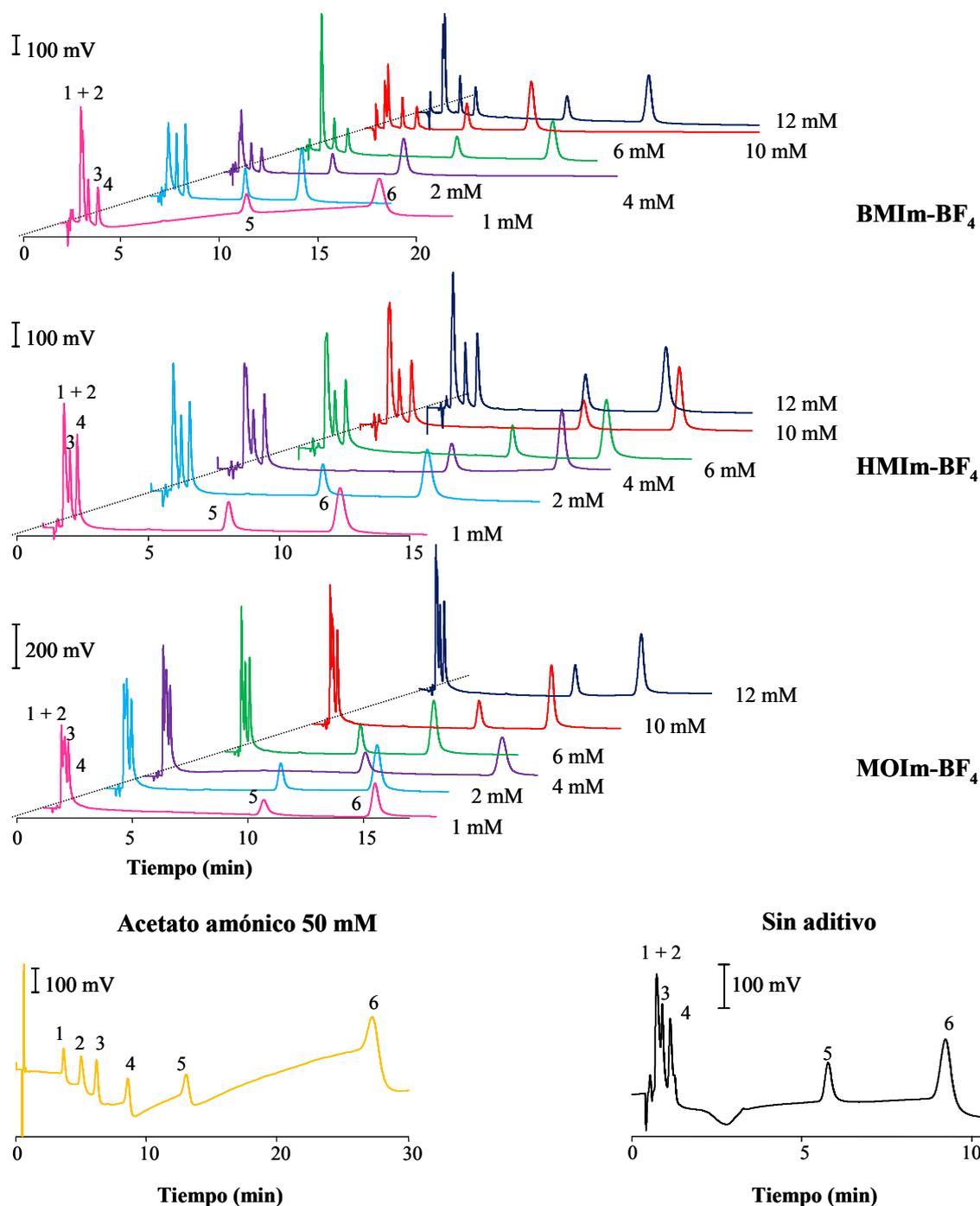


Figura III.3.2 (C). Cromatogramas de las AHs utilizando diferentes concentraciones de LIs, acetato amónico 50 mM y sin aditivo en la fase móvil con la columna ABZ+plus y detección electroquímica. Orden de elución de las aminas y su concentración: (1) NH ($1.45 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) H ($0.490 \mu\text{g mL}^{-1}$), (3) Trp-P-2 ($0.443 \mu\text{g mL}^{-1}$), (4) Trp-P-1 ($1.40 \mu\text{g mL}^{-1}$), (5) A α C ($4.92 \mu\text{g mL}^{-1}$), y (6) MeA α C ($0.583 \mu\text{g mL}^{-1}$). El contenido de acetonitrilo es del 18% (v/v) en todos los casos.

Atendiendo a la variación de los factores de retención con la concentración de los LIs, las AHs pueden clasificarse, independientemente de la naturaleza del LI, en dos grupos diferenciados: el primer grupo formado por las aminas (NH, H, Trp-P-2 y Trp-P-1) y el segundo grupo, por las aminas menos polares ($A\alpha C$ y $MeA\alpha C$). En la Figura III.3.3 se muestra la variación de los factores de retención calculados para las aminas Trp-P-2 y $A\alpha C$, como ejemplos representativos, en las tres fases estacionarias cuando se utilizan los tres LIs como aditivos a la fase móvil.

Para el primer grupo, podemos observar que para las fases estacionarias NovaPak® y TSK-gel ODS 80TM, con una actividad moderada de los grupos silanol, la retención de las aminas disminuye a medida que aumenta la concentración de LI. Esta disminución es especialmente destacable a bajas concentraciones de LI, manteniéndose prácticamente constante a concentraciones superiores a 2 mM. Por el contrario, cuando se emplea la fase estacionaria ABZ+plus los factores de retención aumentan ligeramente a bajas concentraciones de LI, aunque se mantienen prácticamente constantes a altas concentraciones de aditivos, siendo en esta fase estacionaria donde se encuentran los factores de retención más bajos.

Por su parte, las aminas $A\alpha C$ y $MeA\alpha C$ presentan factores de retención similares en las tres fases estacionarias, estos factores varían ligeramente con la concentración de aditivo, pero su tendencia es permanecer constante a altas concentraciones.

A pesar de que los menores factores de retención se obtienen cuando se utiliza el MOIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil, la resolución de los picos se ve perjudicada. Es necesario combinar una buena resolución entre los picos de las aminas, y especialmente entre las cuatro primeras AHs, y unos factores de retención que no sean excesivamente altos. A la vista de los resultados obtenidos, el LI BMIm-BF₄ da lugar a la mejor resolución entre las cuatro primeras aminas (tal y como se aprecia en las Figuras III.3.2), y a pesar de que esta mejora se produce a expensas de un mayor tiempo de análisis, los tiempos de retención de todas las aminas son significativamente inferiores a los que se obtienen cuando se emplea acetato amónico como aditivo [182].

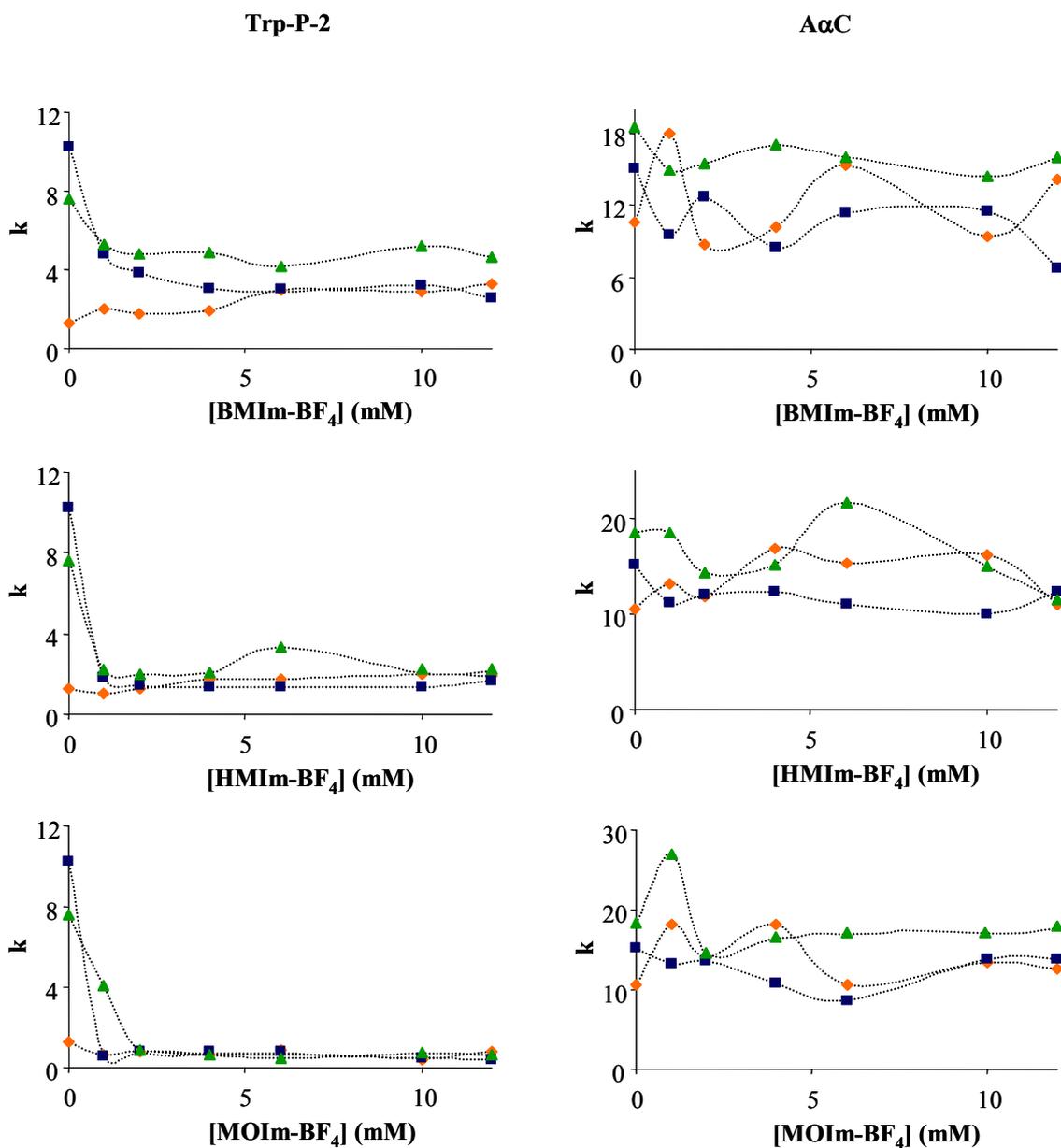


Figura III.3.3. Variación del factor de retención de las aminas Trp-P-2 y AαC cuando se emplean los tres LIs como aditivos a la fase móvil en las tres fases estacionarias estudiadas: (♦) ABZ+plus, (■) NovaPak® y (▲) TSK-gel ODS 80TM.

Con objeto de comparar los factores de retención en presencia de LIs con los obtenidos en presencia de acetato amónico, generalmente utilizado para la determinación de aminas con detección electroquímica, en la Tabla III.3.1 se muestran los factores de retención cuando se emplea 50 mM de acetato amónico como aditivo a la fase móvil. Para todas las

AHs los factores de retención en presencia de acetato amónico son superiores que los que se obtienen con los distintos LIs empleando cualquiera de las fases estacionarias.

Tabla III.3.1. Factores de retención para las AHs cuando se emplea acetato amónico 50 mM (pH 6) como aditivo a la fase móvil.

Compuesto	Factor de retención		
	NovaPak®	TSK-gel ODS 80™	ABZ+plus
NH	4.46	7.36	6.27
H	6.49	11.3	8.97
Trp-P-2	9.18	17.2	11.3
Trp-P-1	14.1	23.9	16.1
A α C	21.3	32.4	25.1
MeA α C	53.6	-	53.7

Debemos destacar que esta importante disminución en los factores de retención, cuando se emplean los LIs como aditivos a la fase móvil, puede ser debida no solamente al efecto supresor de los LIs sino a la diferencia de pH de la fase móvil (pH 3.6 y pH 6, cuando se utilizan LIs y acetato amónico, respectivamente). Cabría pensar que un incremento en el pH de la fase móvil produce un aumento de los factores de retención, debido a una disminución en la ionización de las aminos, pero hemos comprobado (tal y como se aprecia en las Figuras III.3.2 A y B) que, en todos los casos, se obtienen mayores factores de retención en ausencia de LIs a pH 3.6.

Otro de los parámetros cromatográficos estudiados en presencia de los LIs como aditivos a la fase móvil es el área de los picos. Las AHs pueden clasificarse en tres grupos atendiendo a la variación de las áreas de sus picos cromatográficos con la variación de la concentración de los LIs: el primer grupo está formado por las aminos NH y H; Trp-P-2 y Trp-P-1 forman el segundo grupo y, finalmente, el tercer grupo lo forman las aminos A α C y MeA α C. En la Figura III.3.4 se muestra la variación de las áreas de pico frente a la concentración de aditivo para NH, Trp-P-1 y MeA α C como ejemplos representativos de cada grupo, para la columna NovaPak®.

Para el primer grupo, formado por las aminos NH y H, con alguna excepción, las áreas de pico más bajas se obtienen cuando se emplea acetato amónico 50 mM como aditivo a la

fase móvil. Las columnas NovaPak® y TSK-gel ODS 80TM, debido a que presentan una actividad similar (moderada) de los grupos silanol residuales, dan lugar a la misma tendencia con respecto a las áreas de los picos de estas dos aminas, no existiendo grandes variaciones en las mismas con el aumento de la concentración de los LIs, excepto para NH en presencia de BMIm-BF₄. En general, las mayores áreas de pico se obtienen con la columna NovaPak®, especialmente cuando el HMIm-BF₄ se utiliza como aditivo a la fase móvil. Cuando se emplea la fase estacionaria ABZ+plus, estas dos aminas no se resuelven en ningún caso, excepto cuando se emplea acetato amónico 50 mM como aditivo a la fase móvil, que da lugar a las menores áreas de pico para estas aminas.

Para las aminas Trp-P-2 y Trp-P-1, que constituyen el segundo grupo, en general, las mayores áreas de pico se observan cuando se utiliza HMIm-BF₄ como aditivo. Estas aminas presentan la particularidad de que, cuando se emplean los LIs BMIm-BF₄ y MOIm-BF₄, las áreas de pico disminuyen a concentraciones comprendidas entre 1 y 2 mM, y para concentraciones superiores a ésta, aumentan a medida que aumenta la concentración del LI. Las áreas de pico obtenidas son menores en algunos casos que las obtenidas con acetato amónico.

El tercer grupo, constituido por las aminas menos polares, AαC y MeAαC, en general, presenta un comportamiento similar en las tres fases estacionarias, aumentando las áreas de pico ligeramente a medida que aumenta la cadena alquílica de los LIs.

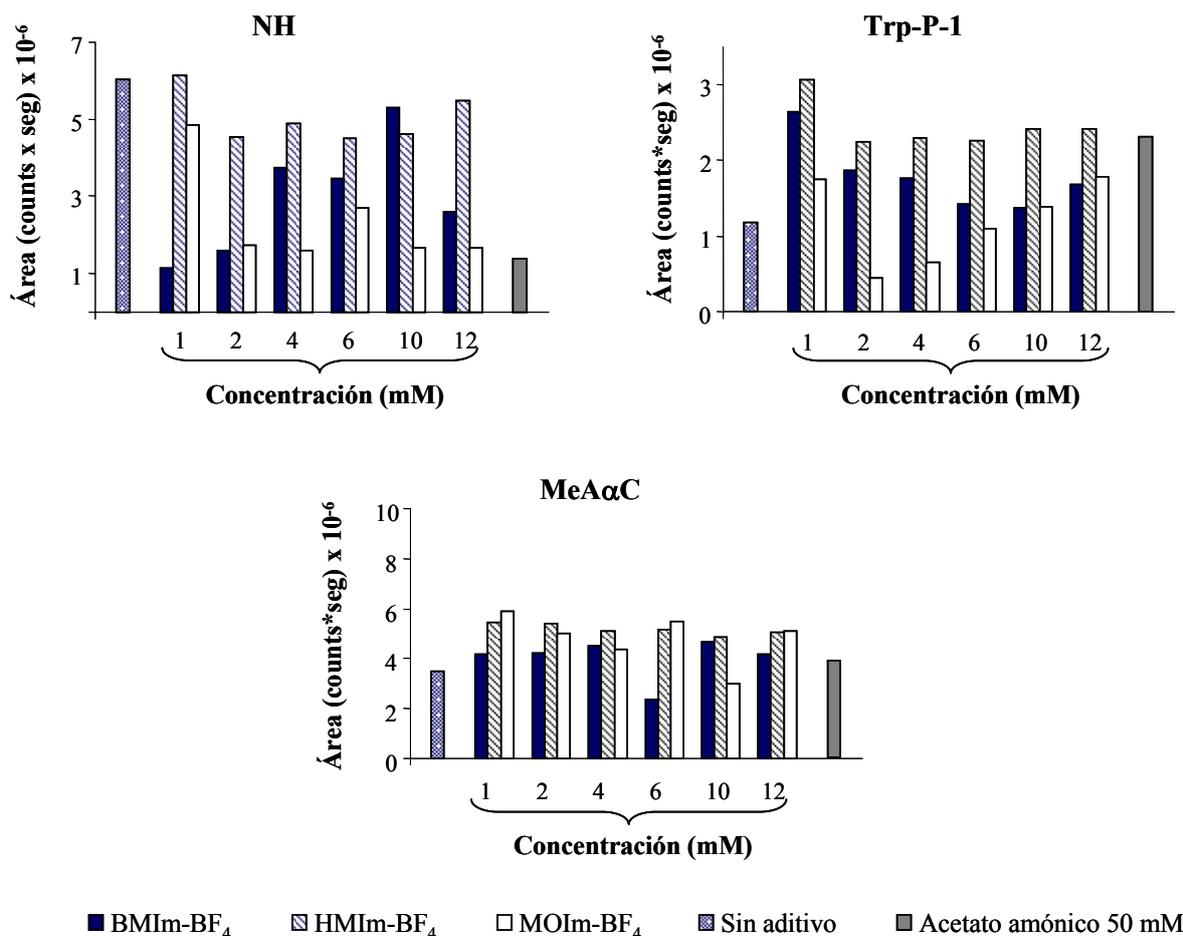


Figura III.3.4. Variación de las áreas de pico de AHs frente a la concentración de LIs como aditivos a la fase móvil para la columna NovaPak®, en presencia de acetato amónico 50 mM y en ausencia de aditivo.

La altura y el ancho de los picos cromatográficos son parámetros relacionados entre sí, a la vez que con la retención de los analitos: a menores tiempos de retención, los picos se hacen más estrechos y más altos. En general, tal y como puede verse en las Figuras III.3.2, cuando se emplea acetato amónico como aditivo a la fase móvil, se obtienen los mayores anchos de pico y las menores alturas. Las mayores alturas de pico las encontramos con la columna ABZ+plus. Esta columna tiene una baja actividad de los grupos silanol y la retención de los analitos es baja, aumentando con la concentración de los LIs. Por el contrario, los picos con menores alturas y más anchos los observamos con la columna TSK-gel ODS 80TM, en este caso debido a que esta columna proporciona los mayores tiempos de retención. Por su parte, la columna NovaPak® presenta un comportamiento intermedio, aunque similar al de la columna TSK-gel ODS 80TM. La tendencia general, para estas dos columnas es que a medida

que aumenta la concentración de los LIs, los picos son más altos y más estrechos, debido a una disminución en la retención de los analitos.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que un incremento en la concentración de los LIs provoca una disminución tanto en los factores de retención como en los anchos de los picos cromatográficos de las aminas estudiadas. Teniendo en cuenta estas afirmaciones, los LIs serían mejores aditivos a la fase móvil para la determinación cromatográfica de AHs mediante HPLC con detección electroquímica, comparados con el acetato amónico, que es el aditivo que se emplea normalmente en esta determinación.

III.3.3 Efecto de los LIs en la eficacia y simetría de los picos

El cambio de la eficacia se ha definido mediante la relación entre el número de platos teóricos medido en presencia de aditivo y el número de platos teóricos en ausencia de aditivo (N/N_0). Tal y como se define el número de platos teóricos, la eficacia de una fase estacionaria es una función directamente proporcional al cuadrado del tiempo de retención de un analito e inversamente proporcional al cuadrado de su ancho de pico cromatográfico. Si la presencia de un aditivo, como pueden ser los LIs, da lugar a una disminución en el tiempo de retención y por consiguiente, los picos cromatográficos tienden a ser más estrechos, con respecto a los parámetros obtenidos en ausencia de aditivo, podemos encontrar dos tendencias: que disminuya la eficacia si se produce una gran disminución en el tiempo de retención o que aumente si la disminución del ancho de pico es grande con respecto a la de los t_R .

Siguiendo la misma tendencia que han mostrado para los parámetros cromatográficos estudiados anteriormente, las seis AHs estudiadas presentan dos tendencias atendiendo a su comportamiento con respecto a la eficacia, expresada como N/N_0 , cuando se emplean LIs como aditivos a la fase móvil. Para las aminas NH y H un aumento en la concentración de los LIs BMIm-BF₄ y HMIm-BF₄, da lugar a un aumento en la eficacia. Se ha de destacar que cuando se emplea MOIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil en las columnas NovaPak® y ABZ+plus, no es posible la separación de estas dos aminas, por lo que estamos considerándolas en un solo pico cromatográfico, ligeramente más ancho que si sólo tuviéramos una de ellas, por lo que se pueden observar grandes variaciones y aumentos en la eficacia en estos casos. Estos datos no son eficacias reales para estas aminas individualmente.

Para el resto de las aminas se encuentran ligeras variaciones al aumentar la concentración de los LIs en las tres fases estacionarias, debidas principalmente, a las propias variaciones de los tiempos de retención y los anchos de los picos cromatográficos con el aumento de la concentración de los LIs.

En la Figura III.3.5 podemos observar las eficacias, expresadas como N/N_0 , cuando se emplean los LIs (1 y 10 mM) y acetato amónico (50 mM) como aditivos a la fase móvil para las aminas H, Trp-P-1 y AαC como ejemplos representativos de cada uno de los grupos citados anteriormente.

Cuando se emplea como aditivo a la fase móvil acetato amónico 50 mM, para las tres fases estacionarias, las eficacias son mucho mayores que para los LIs. Esto se debe principalmente a que, en presencia de este aditivo, los tiempos de retención que presentan las aminas son mucho mayores que cuando se emplean los LIs. La excepción la encontramos para las aminas AαC y MeAαC en la fase estacionaria ABZ+plus.

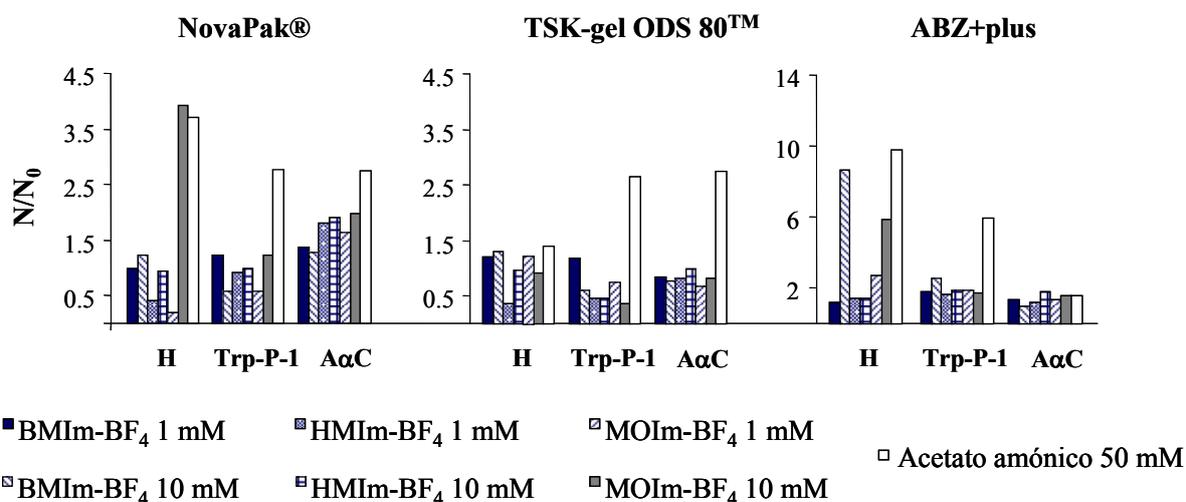


Figura III.3.5. Eficacias expresadas como N/N_0 para las aminas H, Trp-P-1 y AαC en presencia de LIs y acetato amónico como aditivos a la fase móvil.

Para estudiar la simetría de los picos, se han calculado los factores de cola, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$FC = 0.5 \cdot \left(\frac{t_b - t_a}{t_R - t_a} \right)$$

donde t_R es el tiempo de retención, y t_a y t_b son los tiempos en los frentes y colas de los picos para una altura del 5% de la altura total de pico.

Al estudiar los factores de cola obtenidos para cada amina en presencia de los tres LIs, o acetato amónico, como aditivos a la fase móvil en las tres fases estacionarias, se observa que los valores que se obtienen matemáticamente no reflejan lo que sucede cromatográficamente. En la Figura III.3.6 se muestra, como ejemplo representativo, una ampliación de la sección de los cromatogramas correspondientes al pico de una amina, en este caso A α C, cuando se emplea BMIm-BF₄ 1 mM y acetato amónico 50 mM como aditivos en la fase móvil, así como en ausencia de aditivo.

Tal y como se ha indicado en el apartado III.2.3, atendiendo a la expresión utilizada para el cálculo de los factores de cola, para que un pico sea simétrico, es decir, $F_c = 1$, la diferencia $(t_b - t_a)$ debe ser el doble que $(t_R - t_a)$. Como puede observarse en la Figura III.3.6, cuando se emplea acetato amónico 50 mM como aditivo a la fase móvil prácticamente se cumple que $(t_b - t_a) = 2 \cdot (t_R - t_a)$, por lo que matemáticamente encontramos factores de cola próximos a la unidad, aún cuando la forma de los picos dista mucho de ser simétrica, debido a las perturbaciones en la línea base ocasionadas por los elevados valores de la corriente residual (comentado en el apartado III.3.1) En cambio, tanto en ausencia de aditivos como en presencia de LIs, observamos una pequeña cola en los picos, pero éstos presentan unos tiempos de retención menores, una línea base más estable y, en definitiva, un mejor cromatograma que cuando se emplea acetato amónico. Como puede observarse en las Figuras III.3.2, cuando se emplea cualquiera de los tres LIs en las tres fases estacionarias, se observan estas pequeñas colas en los picos, que son mayores o menores en función del efecto supresor del LI utilizado.

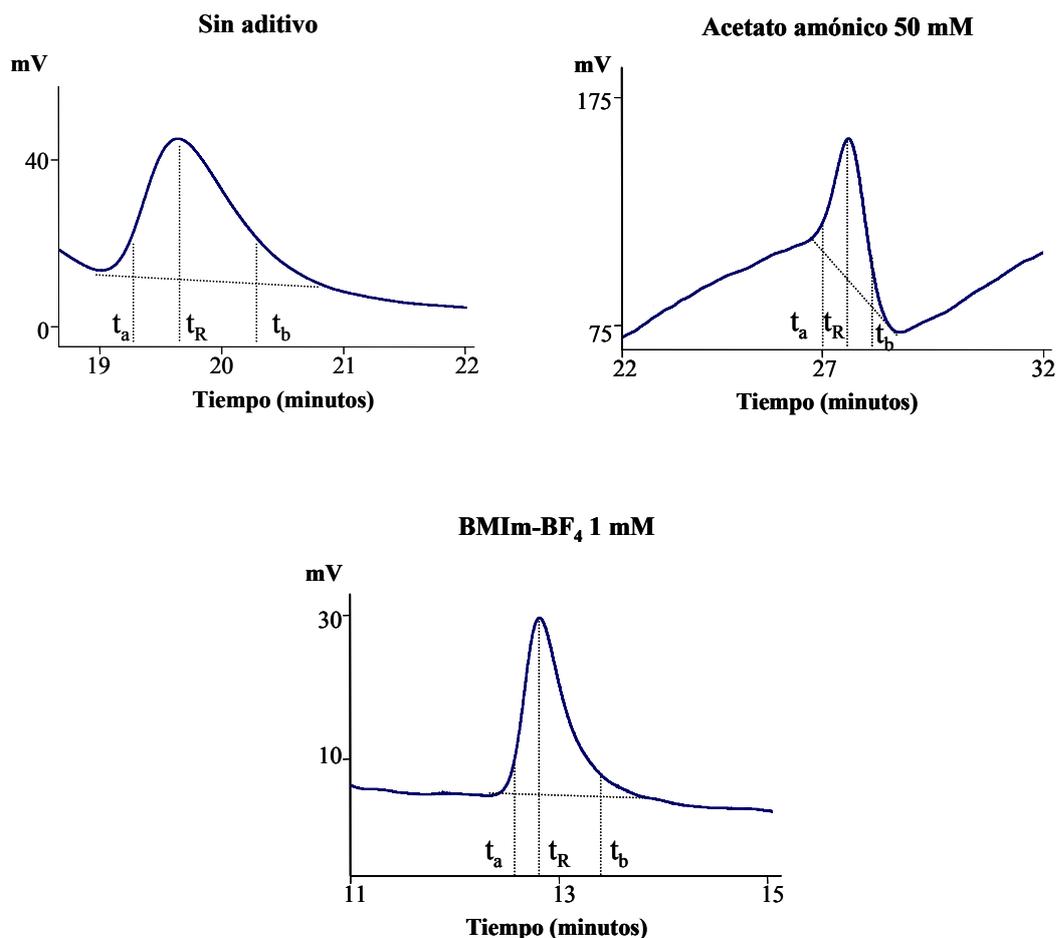


Figura III.3.6. Sección de los cromatogramas correspondientes a la amina A α C cuando se emplean aditivos a la fase móvil, así como en ausencia de los mismos.

III.3.4 Influencia del contenido de disolvente orgánico en la fase móvil cuando se emplean LIs como aditivos

El contenido de disolvente orgánico o modificador orgánico en cromatografía en fase inversa tiene efectos de moderados a intensos sobre la retención, la selectividad y las propiedades de pico para cualquier tipo de soluto, y debe ser fijado a los valores óptimos para garantizar el éxito de la separación.

Los factores de retención, en una separación isocrática, pueden relacionarse con la fracción de volumen de disolvente orgánico empleado en la fase móvil mediante la ecuación lineal de Soczewinski-Wachmaister [184, 185]:

$$\log k = \log k_w - S\phi$$

donde φ es la fracción de volumen del modificador orgánico empleado en la fase móvil, k_w es el factor de retención del analito cuando la fase móvil está libre de modificador orgánico; k es el factor de retención del analito en presencia del modificador orgánico, y S denota la pendiente de la curva de regresión (y es una constante para un analito dado). S también es conocido como “fuerza de elución” en eluyentes acuo-orgánicos sin aditivos.

Con el objetivo de elucidar el papel del acetonitrilo en la separación de las AHs en las tres columnas estudiadas mediante HPLC con detección electroquímica, cuando se emplean LIs como aditivos a la fase móvil, se determinaron los factores de retención para porcentajes de acetonitrilo comprendidos entre el 5 y el 50% (v/v) en las fases móviles que contenían 1 mM de los LIs y en fases móviles libres de modificador orgánico.

Las curvas obtenidas al representar $\text{Log } k$ vs el porcentaje de acetonitrilo presentan buena linealidad en todo el rango de porcentajes de acetonitrilo estudiado, con coeficientes de correlación, R , comprendidos entre 0.955 y 0.999. La Tabla III.3.2 muestra los valores obtenidos para $\text{Log } k_w$, S y R , para cada amina en las tres columnas estudiadas cuando se emplean fases móviles conteniendo LIs a una concentración 1 mM en todos los casos.

Tabla III.3.2. Cambios en el factor de retención extrapolado a cero de disolvente orgánico ($\log k_w$) y fuerza de elución (S) inducidos por BMIm-BF₄, HMIIm-BF₄ y MOIm-BF₄ (1 mM en todos los casos) en las tres fases estacionarias estudiadas.

		NovaPak®				TSK-gel ODS 80™				ABZ+plus			
BMIm-BF ₄		Log kw	S	R	Log kw	S	R	Log kw	S	R	Log kw	S	R
NH		1.38	-0.048	0.983	0.956	-0.037	0.999	0.839	-0.032	0.992			
H		1.48	-0.050	0.969	1.10	-0.041	0.995	0.875	-0.033	0.991			
Trp-P-2		1.77	-0.056	0.972	1.37	-0.047	0.990	0.917	-0.031	0.969			
Trp-P-1		1.76	-0.046	0.972	1.34	-0.038	0.980	1.77	-0.064	0.972			
AαC		2.27	-0.056	0.986	1.99	-0.044	0.987	2.21	-0.049	0.995			
MeAαC		2.07	-0.041	0.994	2.15	-0.041	0.995	2.55	-0.053	0.996			
HMIIm-BF ₄		Log kw	S	R	Log kw	S	R	Log kw	S	R	Log kw	S	R
NH		0.900	-0.042	0.955	1.13	-0.048	0.999	0.8361	-0.038	0.995			
H		1.02	-0.046	0.974	1.33	-0.058	0.999	0,9171	-0.041	0.997			
Trp-P-2		1.33	-0.052	0.982	1.57	-0.059	0.996	1,297	-0.052	0.991			
Trp-P-1		1.60	-0.057	0.982	1.87	-0.063	0.995	1,764	-0.071	0.999			
AαC		2.10	-0.053	0.984	2.06	-0.043	0.997	2,091	-0.050	0.995			
MeAαC		2.29	-0.051	0.978	2.33	-0.043	0.998	2,369	-0.053	0.998			
MOIm-BF ₄		Log kw	S	R	Log kw	S	R	Log kw	S	R	Log kw	S	R
NH		0.570	-0.052	0.992	1.29	-0.071	0.994	0.855	-0.060	0.999			
H		0.763	-0.065	0.993	1.21	-0.052	0.990	0.921	-0.064	0.996			
Trp-P-2		1.02	-0.064	0.993	1.63	-0.078	0.988	1.17	-0.064	0.998			
Trp-P-1		1.31	-0.070	0.993	1.82	-0.078	0.988	1.48	-0.071	0.998			
AαC		2.11	-0.064	0.997	1.96	-0.042	0.991	2.24	-0.063	0.996			
MeAαC		2.52	-0.071	0.997	2.07	-0.039	0.991	2.46	-0.065	0.996			

En la Tabla III.3.3 se muestran los valores obtenidos para $\text{Log } k_w$, S y R , para cada amina cuando se emplean fases móviles libres de aditivos en una fase estacionaria con moderada actividad de los grupos silanol residuales (NovaPak®) y una fase estacionaria con baja actividad de los grupos silanol residuales (ABZ+plus).

Tabla III.3.3. Cambios en el factor de retención extrapolado a cero de disolvente orgánico ($\log k_w$) y fuerza de elución (S) en fases móviles libres de aditivos, para las fases estacionarias indicadas.

Compuesto	NovaPak®			ABZ+plus		
	Log k_w	S	R	Log k_w	S	R
NH	1.35	-0.033	0.980	1.24	-0.060	0.994
H	1.23	-0.029	0.987	1.30	-0.062	0.994
Trp-P-2	1.84	-0.045	0.991	1.58	-0.073	0.994
Trp-P-1	1.83	-0.043	0.995	1.93	-0.083	0.999
A α C	1.56	-0.033	0.990	2.25	-0.051	0.988
MeA α C	2.12	-0.043	0.992	2.57	-0.055	0.987

Como tendencia general, puede observarse que la presencia de los tres LIs en la fase móvil disminuye el término $\text{Log } k_w$ e incrementa el término S (Tabla III.3.2) con respecto a fases móviles libres de aditivos (Tabla III.3.3). Estos dos efectos son opuestos. Si S permanece constante, cuando el término $\text{Log } k_w$ disminuye, habrá una disminución en la retención del analito. Por otra parte, a valores constantes de $\text{Log } k_w$, un aumento de S provocará un incremento en la retención del analito [164]. Para cada AHs, los $\text{Log } k_w$ calculados para cada LI y cada columna son diferentes de los obtenidos en ausencia de LIs como aditivos en la fase móvil. Estas diferencias en los valores de $\text{Log } k_w$ probablemente reflejen las diferencias en la manera en la que los LIs interactúan con las fases estacionarias, ya sea adsorbiéndose en la fase estacionaria, o formando pares iónicos con los solutos básicos [164].

Todas las aminas estudiadas muestran el comportamiento esperado: los factores de retención disminuyen linealmente cuando la concentración del modificador orgánico aumenta. Las AHs pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de su comportamiento cuando se comparan entre ellas. Un grupo está constituido por NH, H, Trp-P-2 y Trp-P-1, y el segundo

grupo por las aminas A α C y MeA α C. La Figura III.3.7 muestra los factores de retención ($Log k$) frente a la fracción de volumen de acetonitrilo empleado en la fase móvil (ϕ) para algunas aminas representativas.

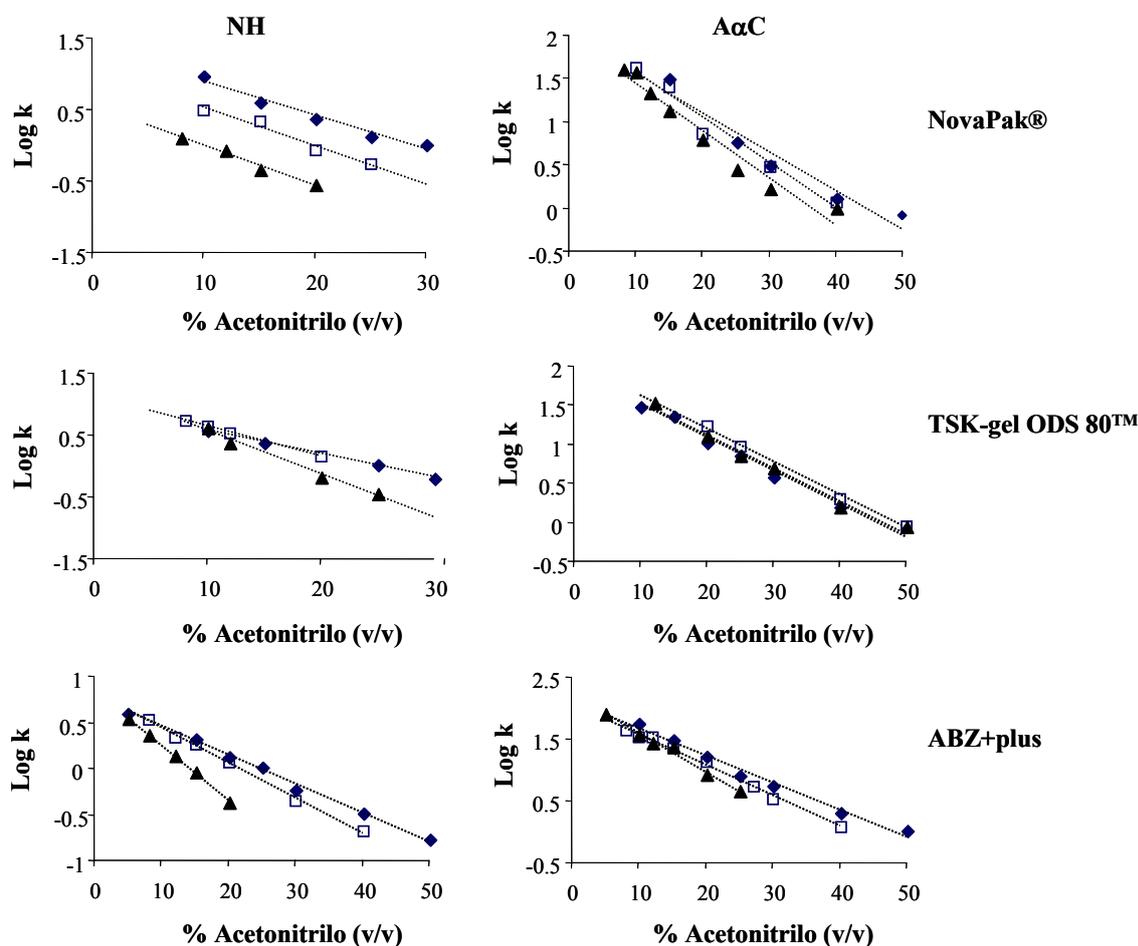


Figura III.3.7. Efecto del contenido en acetonitrilo en el factor de retención de NH y A α C cuando se emplean los tres LIs estudiados como aditivos a la fase móvil en las tres fases estacionarias estudiadas. LIs: (◆) BmIm-BF $_4$, (□) HmIm-BF $_4$, y (▲) MoIm-BF $_4$.

En el primer grupo de aminas, puede observarse que hay importantes diferencias en los valores de $Log kw$ para los tres LIs y las tres columnas. Además, los valores de S son muy similares para cada analito con los tres LIs cuando se utiliza la columna NovaPak $\text{\textcircled{R}}$ (ver Tabla III.3.2). Esta es la razón de las diferencias significativas en los valores de $Log k$ obtenidos con este grupo de aminas cuando se emplea la fase estacionaria NovaPak $\text{\textcircled{R}}$. Sin embargo, hay diferencias en los valores de S cuando se emplean las fases estacionarias ABZ+plus y TSK-

gel ODS 80TM, y de esta manera las diferencias en los valores de $\text{Log } k$ obtenidos no son tan importantes. En el segundo grupo de aminas ($\text{A}\alpha\text{C}$ y $\text{MeA}\alpha\text{C}$), pueden observarse valores similares para $\text{Log } kw$ con los tres LIs, así como similares valores de $\text{Log } k$.

Los estudios de retención llevados a cabo para porcentajes de acetonitrilo comprendidos entre el 5 y el 50% en fases móviles conteniendo 1 mM de cada uno de los LIs estudiados, permite evaluar el comportamiento de las columnas cromatográficas en base a las eficacias y las asimetrías de las AHs consideradas.

El procedimiento seguido consiste en medir la semianchura frontal (A) y de cola (B) al 10% de la altura de los picos cromatográficos de las aminas eluidas a distintas composiciones de fase móvil y representarlas frente al tiempo de retención. La Figura III.3.8 muestra los valores de A y B para las tres columnas en presencia de los distintos LIs. Como se observa existe una dependencia lineal entre las semianchuras de los picos y el tiempo de retención, que se puede expresar como:

$$A = C_{0A} + C_{1A} \cdot t_R$$

$$B = C_{0B} + C_{1B} \cdot t_R$$

Las semianchuras A y B presentan una dependencia casi lineal con el tiempo de retención de los solutos, el cual a su vez se halla correlacionado con la composición de la fase móvil. La correlación entre las semianchuras y los tiempos de retención es útil para predecir (al menos aproximadamente) el perfil del pico (asimetría, B/A), y eficacia, N [186]:

$$N = \frac{41.7 \left(\frac{t_R}{A+B} \right)}{1.25 + \frac{B}{A}}$$

Las pendientes C_{1A} y C_{1B} ofrecen información sobre el comportamiento general del perfil de los picos: la suma de las pendientes se relaciona con la eficacia de la columna, mientras que su cociente es una medida global asociada a la asimetría de los picos. Por otro lado, una pendiente mayor para la semianchura B indicaría que los picos tienen tendencia a eluir con cola.

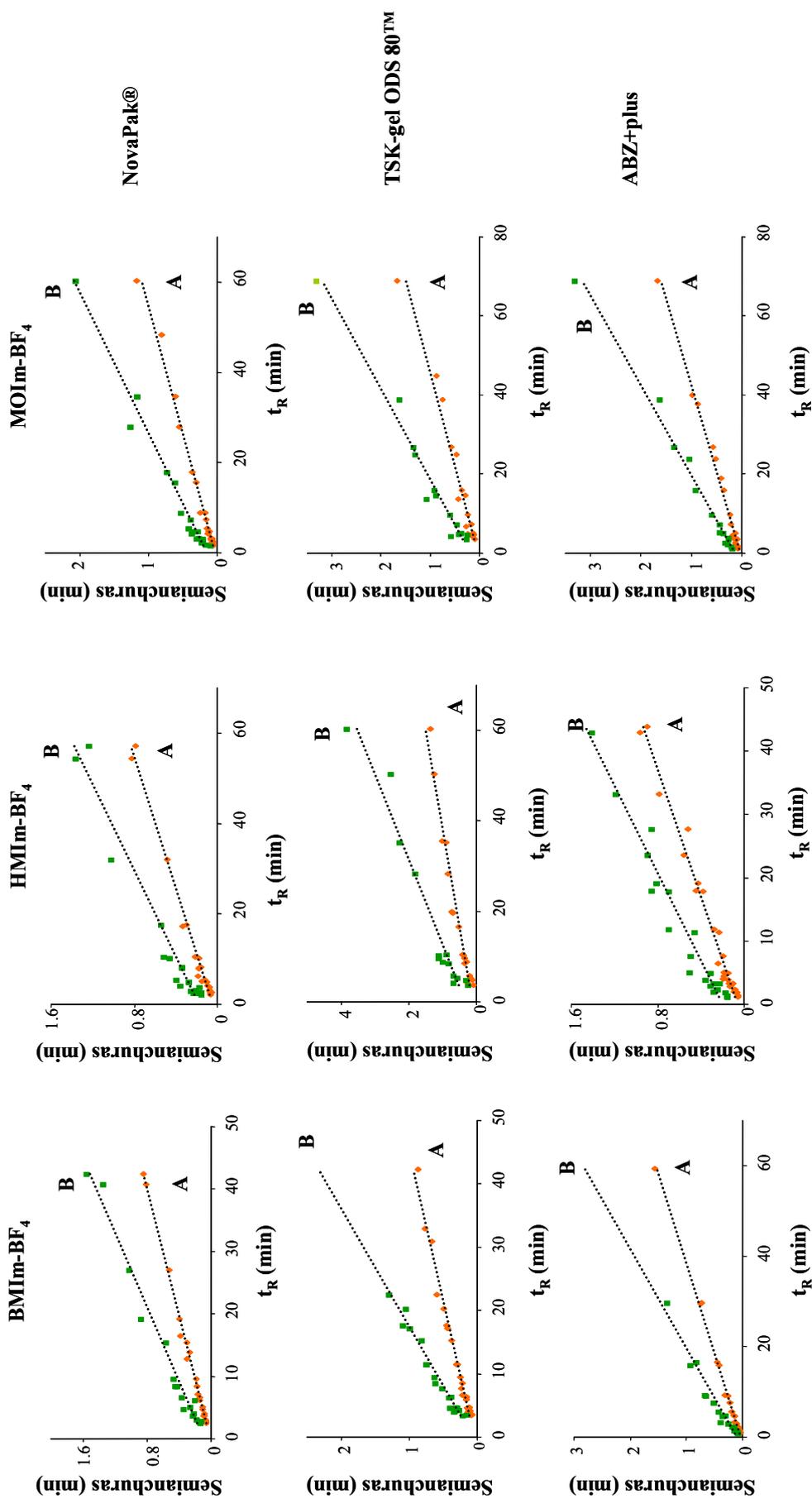


Figura III.3.8. Dependencia de las semianchuras frontal (A) y de cola (B) con el tiempo de retención para las seis AHs en las tres fases estacionarias y con los tres LIs empleados como aditivos de la fase móvil.

Los coeficientes C_{0A} , C_{1A} , C_{0B} y C_{1B} para las tres columnas con los distintos LIs se recogen en la Tabla III.3.4. Como puede observarse, los picos procesados poseen colas ($B > A$), presentándose asimetrías comparables en las columnas NovaPak® y ABZ+plus independientemente del LI utilizado como aditivo, siendo mínimas para el HMIm-BF₄ con valores en torno a 1.5. En la columna TSK-gel ODS 80TM se encuentran las mayores asimetrías, con valores superiores a 2 para todos los LIs estudiados.

La eficacia de la columna, expresada como la suma de las pendientes ($C_{1A} + C_{1B}$), es máxima para la columna TSK-gel ODS 80TM, con valores comprendidos entre 0.065 y 0.076 en presencia de MOIm-BF₄ y HMIm-BF₄, respectivamente, y comparables con las obtenidas cuando se utiliza la columna ABZ+plus. Sin embargo, las menores eficacias se encuentran para la columna NovaPak®, comprendidas entre 0.035 y 0,053 en presencia de HMIm-BF₄ y BMIm-BF₄, respectivamente. Es de destacar que es el BMIm-BF₄ el que conduce a las mayores eficacias independientemente de la fase estacionaria utilizada.

Teniendo en cuenta estos resultados, la combinación del LI BMIm-BF₄ con la fase estacionaria NovaPak®, da lugar a picos más simétricos.

Tabla III.3.4. Parámetros de correlación de las semianchuras frontal (A) y de cola (B) de los picos cromatográficos con los tiempos de retención para las seis aminas en las tres columnas y en presencia de los distintos aditivos.

	$C_{0A} \pm SD$	$C_{1A} \pm SD$	$C_{0B} \pm SD$	$C_{1B} \pm SD$	C_{1B}/C_{1A}	R_A	R_B
BMIIm-BF₄							
NovaPak®	0.013 ± 0.005	0.0196 ± 0.0003	0.09 ± 0.02	0.033 ± 0.001	1.709	0.997	0.987
TSK-gel ODS 80™	0.04 ± 0.01	0.0213 ± 0.0006	0.07 ± 0.03	0.053 ± 0.002	2.512	0.989	0.982
ABZ+plus	0.028 ± 0.006	0.0253 ± 0.0003	0.11 ± 0.03	0.045 ± 0.003	1.790	0.998	0.969
HMIIm-BF₄							
NovaPak®	0.048 ± 0.007	0.0137 ± 0.0003	0.18 ± 0.02	0.021 ± 0.001	1.533	0.993	0.974
TSK-gel ODS 80™	0.12 ± 0.03	0.023 ± 0.001	0.33 ± 0.09	0.053 ± 0.003	3.861	0.976	0.972
ABZ+plus	0.06 ± 0.01	0.0200 ± 0.0006	0.20 ± 0.03	0.029 ± 0.002	1.455	0.989	0.972
MOIIm-BF₄							
NovaPak®	0.033 ± 0.007	0.0177 ± 0.0004	0.15 ± 0.02	0.032 ± 0.001	1.808	0.995	0.986
TSK-gel ODS 80™	0.03 ± 0.03	0.021 ± 0.001	0.18 ± 0.05	0.044 ± 0.002	2.066	0.977	0.984
ABZ+plus	0.03 ± 0.01	0.0228 ± 0.0006	0.03 ± 0.03	0.044 ± 0.001	1.934	0.995	0.993

III.3.5 Características analíticas de los métodos cromatográficos cuando se emplean LIs como aditivos a la fase móvil

Una vez estudiado el comportamiento cromatográfico de algunas AHs mediante HPLC con detección electroquímica en tres fases estacionarias y en presencia de tres LIs como aditivos a la fase móvil, resulta interesante seleccionar las mejores condiciones cromatográficas para cada LI (concentración de aditivo y porcentaje de acetonitrilo). Bajo estas condiciones se pueden comparar los parámetros de calidad de los métodos cromatográficos.

La selección de las condiciones cromatográficas óptimas para cada LI se centró en maximizar la resolución cromatográfica (R_s) de las aminas estudiadas, considerando los valores óptimos cuando $R_s > 1.5$ [187]. La R_s se ha calculado según la siguiente expresión:

$$R_s = 2 \cdot \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \right)$$

donde t_{R1} y t_{R2} son los tiempos de retención correspondientes a los analitos 1 y 2, respectivamente, y w_1 y w_2 son los anchos de pico cromatográfico de dichos analitos.

Como se ha comentado en los apartados anteriores, las aminas NH y H presentan bajas resoluciones en algunos casos, por lo que se han seleccionado estas aminas como indicadores de la resolución, es decir, las condiciones cromatográficas óptimas serán aquellas que consigan una buena resolución para estos compuestos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, especialmente la eficacia y la asimetría de los picos, la fase estacionaria NovaPak® es la más adecuada para la separación de las AHs cuando se emplean los LIs como aditivos a la fase móvil (ver Figuras III.3.2).

Asimismo, la concentración de los tres LIs se fijó en 1 mM debido a que, a partir de los resultados obtenidos en los estudios realizados anteriormente, esta concentración es suficiente para obtener los beneficios de los LIs como aditivos a la fase móvil, tal y como puede verse en las Figuras III.3.2.

Con el objeto de mejorar la resolución de las aminas NH y H, a la vez que disminuir los tiempos de análisis, se estudiará el efecto de pequeñas variaciones en los porcentajes de acetonitrilo. Para los LIs BMIm-BF₄ y HMIm-BF₄, esta situación de compromiso se alcanza

con los porcentajes de acetonitrilo del 19 y 20%, con unos valores de R_s para estas aminas de 3.3 y 1.5, respectivamente. En cambio, el LI MOIm-BF₄, debido a que presenta el mayor efecto supresor de los grupos silanol residuales de la fase estacionaria, impide la resolución de NH y H, incluso a bajas concentraciones del LI. Al mismo tiempo, para no disminuir la resolución entre estas aminas (que eluyen en un solo pico cromatográfico) y Trp-P-2, en este caso disminuimos el porcentaje de acetonitrilo al 15%. En la Figura III.3.9 se muestran algunos cromatogramas representativos obtenidos bajo las condiciones óptimas para cada uno de los LIs. Hay que destacar que los tiempos cromatográficos totales son menores de 40 minutos en todos los casos.

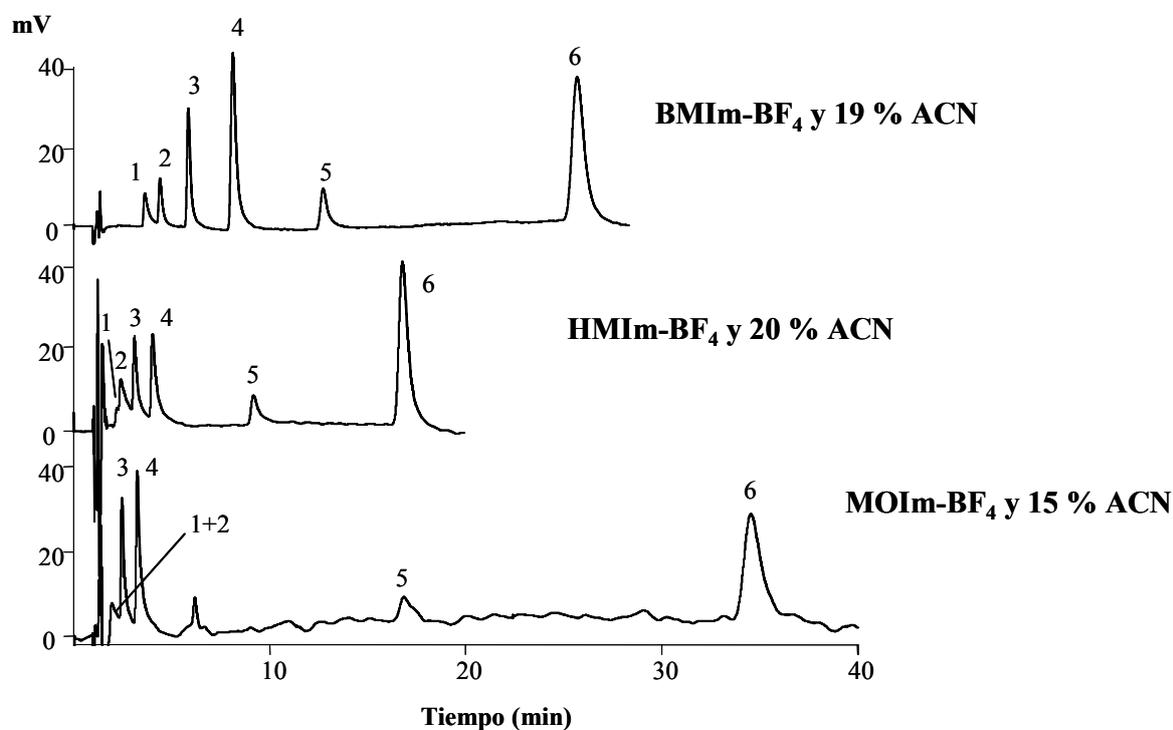


Figura III.3.9. Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones óptimas para cada LI (1 mM) utilizando como aditivo a la fase móvil con la columna NovaPak®. AHs y concentraciones: (1) NH ($0.483 \mu\text{g mL}^{-1}$), (2) H ($0.163 \mu\text{g mL}^{-1}$), (3) Trp-P-2 ($0.148 \mu\text{g mL}^{-1}$), (4) Trp-P-1 ($0.466 \mu\text{g mL}^{-1}$), (5) A α C ($0.644 \mu\text{g mL}^{-1}$), y (6) MeA α C ($0.194 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabla III.3.5. Parámetros de calidad de los métodos cromatográficos obtenidos para cada LI bajo las condiciones óptimas.

Compuesto	Rango de linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(Pendiente \pm SD) $\times 10^{-4}$	R	RSD ^a (%)
BMIIm-BF₄ 1 mM y 19% (v/v) de acetonitrilo				
NH	0.048 – 2.420	198 \pm 1	0.999	6.97 (1.45)
H	0.016 – 0.817	687 \pm 14	0.998	6.25 (0.49)
Trp-P-2	0.015 – 0.738	314 \pm 5	0.999	2.56 (0.44)
Trp-P-1	0.047 – 2.330	194 \pm 5	0.998	6.87 (1.40)
A α C	0.064 – 3.220	50 \pm 1	0.999	5.83 (1.93)
Me α AC	0.019 – 0.972	950 \pm 10	0.999	2.24 (0.58)
HMIIm-BF₄ 1 mM y 20% (v/v) de acetonitrilo				
NH	0.121 – 2.416	193.0 \pm 0.2	0.986	7.04 (1.45)
H	0.048 – 0.817	480 \pm 2	0.995	7.03 (0.49)
Trp-P-2	0.037 – 0.738	1850 \pm 4	0.998	7.88 (0.44)
Trp-P-1	0.116 – 2.330	1030 \pm 1	0.999	5.63 (1.40)
A α C	0.161 – 3.220	273 \pm 2	0.986	8.04 (1.93)
Me α AC	0.049 – 0.972	72 \pm 17	0.998	8.28 (0.58)
MOIm-BF₄ 1 mM y 15% (v/v) de acetonitrilo				
NH + H	0.162 – 3.233	15 \pm 1	0.991	8.26 (1.94)
Trp-P-2	0.116 – 2.330	219 \pm 3	0.999	2.76 (0.44)
Trp-P-1	0.161 – 3.220	125 \pm 17	0.965	8.04 (1.40)
A α C	0.049 – 0.972	271 \pm 1	0.992	7.57 (1.93)
Me α AC	0.169 – 3.233	7780 \pm 12	0.999	7.62 (0.58)

^aDesviación estándar relativa. Analizadas 5 muestras durante 3 días consecutivos. Los valores entre paréntesis indican las concentraciones empleadas ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

La Tabla III.3.5 muestra los parámetros de calidad del método cromatográfico para cada LI en las condiciones óptimas mencionadas anteriormente. Puede observarse que la precisión de los métodos cromatográficos propuestos, calculados como desviaciones estándar relativas, RSD (%), oscilan entre 2.24 y 8.28%, lo cual demuestra la repetitividad de los métodos. Además, todas las curvas de calibrado presentan buena linealidad en los rangos de concentración estudiados, con coeficientes de correlación, R, superiores a 0.99 en todos los casos, con la excepción de Trp-P-1 cuando se emplea MOIm-BF₄.

La mejora más importante que se obtiene a partir del uso de los LIs como aditivos a la fase móvil se encuentra en los límites de detección (LD). La Tabla III.3.6 muestra los LD obtenidos con los LIs bajo las condiciones óptimas, calculados como tres veces la relación señal-ruido, así como una comparación con los LD obtenidos empleando HPLC con detección electroquímica con acetato amónico como aditivo a la fase móvil [183].

Tabla III.3.6. Límites de detección obtenidos cuando se emplean tanto los LIs como acetato amónico 50 mM como aditivos a la fase móvil.

Compuesto	LD (ng inyectados)			
	BMIIm-BF ₄	HMIIm-BF ₄	MOIm-BF ₄	Acetato amónico
NH	0.122	0.070		0.025
H	0.124	0.019	0.580	0.025
Trp-P-2	0.010	0.058	0.014	0.005
Trp-P-1	0.026	0.280	0.052	0.054
AαC	0.026	0.720	0.188	0.022
MeAαC	0.002	0.190	0.520	0.033

Tal y como puede verse en la Tabla III.3.6, los menores LD se obtienen al emplear BMIIm-BF₄ como aditivo. Por otra parte, los LD obtenidos cuando se emplean LIs como aditivos a la fase móvil son comparables con los obtenidos por otros autores cuando se emplea acetato amónico 50 mM. En este último caso, cabe destacar que la metodología empleada utiliza varias etapas de preconcentración.

Como tendencia general, los LIs como aditivos a la fase móvil mejoran la linealidad de las curvas de regresión y los límites de detección para todas las aminas estudiadas

comparados con acetato amónico [182]. Este efecto es especialmente destacable cuando se emplea BMIm-BF₄ como aditivo.

III.3.6 Determinación de AHs en alimentos cárnicos infantiles mediante HPLC con detección electroquímica

En los apartados anteriores hemos estudiado el efecto de los LIs en la separación de un grupo de AHs mediante HPLC con detección electroquímica. A partir de los resultados obtenidos en dichos estudios se han seleccionado las mejores condiciones cromatográficas y desarrollado un método para la determinación de estos compuestos: una fase móvil compuesta por BMIm-BF₄ 1 mM y 19% de acetonitrilo y la fase estacionaria NovaPak®. Con objeto de establecer la aplicabilidad del método desarrollado al análisis de AHs en muestras de alimentos, se llevó a cabo la determinación de las mismas en muestras de alimentos cárnicos infantiles.

La extracción de AHs a partir de productos alimenticios normalmente se lleva a cabo empleando el método descrito por Gross [181, 188]. Este método está caracterizado principalmente por la presencia de varias etapas de SPE, debido a la complejidad de las matrices de los alimentos.

El objetivo principal planteado es el desarrollo de un método que combine la SPE, con una etapa previa de extracción mediante microondas focalizado y un paso criogénico. De esta manera, la etapa de limpieza y preconcentración queda reducida a un solo paso de extracción en fase sólida, simplificando considerablemente el método original descrito por Gross y los métodos basados en modificaciones del mismo [141].

El paso previo de extracción asistida por microondas favorece la solubilización de las muestras, mejorando notablemente la extracción de los analitos. En el Capítulo II hemos demostrado la gran aplicabilidad de la extracción asistida por microondas focalizados en la extracción de AHs en muestras de extractos de carne, usando un porcentaje de metanol en la fase extractante del 2.5%. Este porcentaje se había elegido por ser adecuado tanto para la extracción de las AHs en las muestras como para el paso posterior de microextracción en fase sólida.

Para llevar a cabo la etapa criogénica, algunos autores [189, 190] proponen para otros compuestos llevar a cabo la extracción con metanol o con un disolvente de extracción con un alto contenido en el mismo. Esta fase extractante favorece la separación de la grasa de forma sencilla y efectiva, simplemente enfriando las muestras en un baño de agua-hielo, una vez realizada la extracción.

En el nuevo método propuesto se debe combinar la extracción asistida por microondas con la etapa criogénica, seguidas de la separación de las aminas mediante extracción en fase sólida, usando un cartucho de C₁₈. Los ensayos previos realizados con un alto contenido en metanol en la fase extractante, demostraron que la extracción de las muestras y, posteriormente, de la grasa era más efectiva. Sin embargo, cuando el extracto se pasaba por los cartuchos de SPE, el elevado contenido en metanol de los mismos impedía la retención de las aminas.

El porcentaje de metanol en la fase extractante fue optimizado para asegurar una buena solubilización de las muestras cuando se aplicaban las microondas y, al mismo tiempo, retenciones adecuadas de las aminas en los cartuchos SPE. Para este estudio, se prepararon disoluciones de 5 mL de las AHs con diferentes porcentajes de metanol. Estas disoluciones se hicieron pasar a través de los cartuchos SPE, inyectando una alícuota del eluato obtenido. En la Tabla III.3.7 se muestra el porcentaje de AHs no retenido en el cartucho para los diferentes porcentajes de metanol estudiados.

Como puede observarse de la Tabla III.3.7, con un 30% de metanol en la fase extractante, se consigue una retención cuantitativa de las AHs. Sin embargo, cuando empleamos este porcentaje de metanol al tratar las muestras en el microondas y alcanzar la temperatura que se había optimizado para su extracción (80°C), se produce una disminución en el volumen del disolvente de extracción, debido a una evaporación del metanol. Para evitar la falta de reproducibilidad que provocaría dicha evaporación, se fija el porcentaje de metanol en el 20%. En este caso, al tratar las muestras en el microondas no se produce una disminución apreciable en el volumen de la fase extractante. Además, se comprueba que este porcentaje es lo suficientemente alto para favorecer la separación de la grasa introduciendo la muestra simplemente en un baño de agua-hielo, no siendo necesaria su congelación durante 1 hora.

Tabla III.3.7. Porcentajes de AHs no retenidas en los cartuchos SPE.

Compuesto	% Metanol		
	100	50	30
NH	100	25	-
H	100	27	-
Trp-P-2	100	1.0	-
Trp-P-1	100	-	-
A α C	100	46	-
MeA α C	100	42	-

El pH de los extractos es otro parámetro importante que debe ser controlado en SPE. En el Capítulo II (apartado II.3.3) se había establecido que la concentración óptima de NaOH para conseguir una buena solubilización de las muestras asistida por microondas era de 0.05 M [182]. Sin embargo, esta concentración de NaOH en el extracto no garantiza una buena retención de las aminas en los cartuchos SPE. Algunos autores recomiendan el uso de concentraciones superiores de NaOH para la extracción de las aminas, seguido de una dilución de los extractos con acetato amónico hasta alcanzar un pH 8, previo a la SPE [141]. En ese sentido, se decidió emplear una concentración alta de NaOH en el disolvente de extracción (0.8 M) y, posteriormente, diluir el sobrenadante obtenido con acetato amónico hasta alcanzar un pH 8.

Una vez realizada la extracción asistida por microondas focalizados, el sobrenadante se coloca en un baño de agua-hielo. Al aumentar el porcentaje de metanol en el disolvente de extracción, la separación de la grasa es más fácil y no es necesario congelar la muestra para conseguir la solidificación de la grasa. Posteriormente, se toma el sobrenadante, separándolo de la grasa solidificada, y se centrifuga durante 20 minutos. Como se ha dicho anteriormente, se toma una alícuota de 4 mL que se diluye hasta 20 mL con acetato amónico y se pasan a través del cartucho de SPE, previamente acondicionado como se indica en la Parte Experimental (apartado IV.1.2).

Una vez pasada la muestra a través del cartucho, se introduce un paso de lavado para eliminar las interferencias procedentes de la matriz de las muestras, asegurándonos de que no se produzcan pérdidas de las AHs. Teniendo en cuenta la polaridad de las aminas y la

solubilidad de los extractos de carne en agua, se elige como disolvente de lavado 5 mL de agua MilliQ. En la Figura III.3.10 se muestra un esquema en el cual se recoge la metodología propuesta para el tratamiento de alimentos cárnicos infantiles.

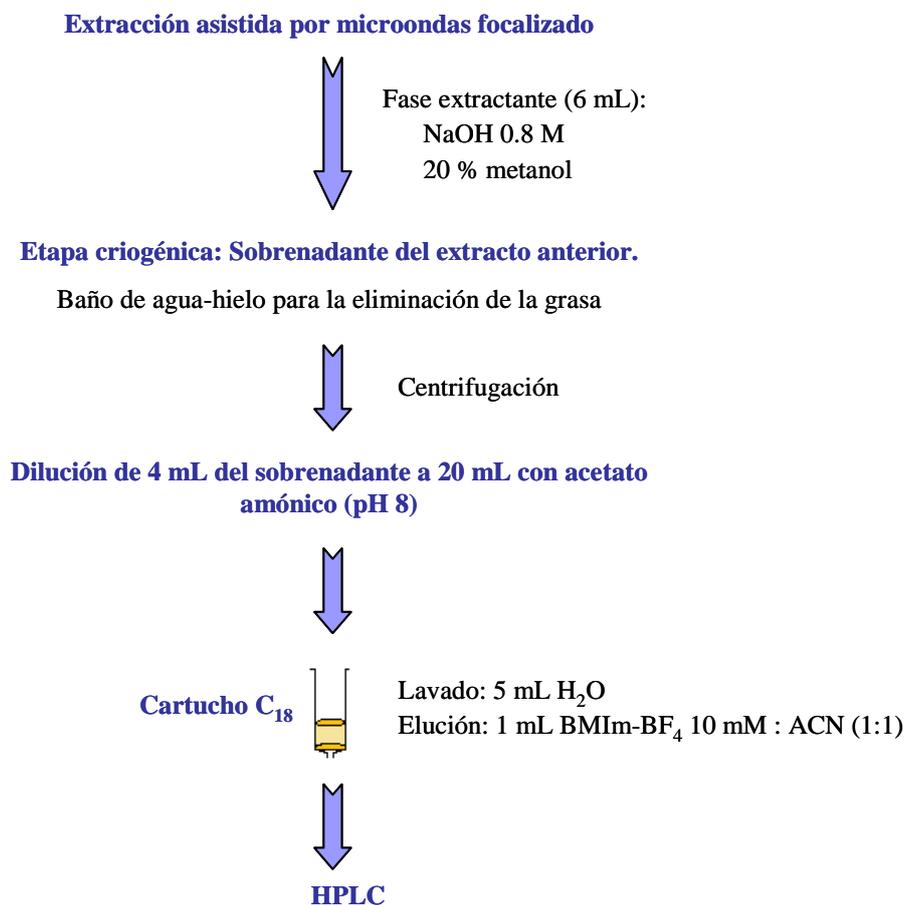


Figura III.3.10. Esquema del tratamiento optimizado para las muestras de alimentos cárnicos infantiles.

El siguiente paso, una vez que las AHs se encuentren retenidas en el cartucho de SPE, consiste en llevar a cabo una cuidadosa selección del disolvente para la elución de estos compuestos. Gross y otros autores [141, 181, 188] emplean una mezcla de metanol y amoníaco (9:1) como disolvente de elución. Sin embargo, la inyección del eluato obtenido genera una línea base extremadamente ruidosa al usar detección electroquímica. Los trabajos mencionados anteriormente realizan, como último paso, una evaporación de la mezcla metanol-amoníaco y una redisolución de los analitos en un pequeño volumen de otro disolvente, generalmente metanol.

En general, cuando se incluye una etapa de evaporación y cambio de disolvente, se pueden producir pérdidas de los analitos, a la vez que se alarga el tiempo requerido para el análisis de las muestras. Con la finalidad de evitar esta última etapa, nuestro objetivo es encontrar un disolvente de elución que nos permita la inyección directa del eluato sin recurrir a un cambio de disolvente.

Si tenemos en cuenta que la naturaleza de los cartuchos SPE empleados (C_{18}) es la misma que las columnas cromatográficas utilizadas en los apartados anteriores, en los que se estudió el efecto de los LIs en la separación cromatográfica de las AHs, estos LIs se presentan como una alternativa eficaz para la elución de las aminas.

Para comprobar la validez de los LIs como disolventes de elución, se realizaron experiencias utilizando como eluyente mezclas de BMIm-BF₄-acetonitrilo, componentes de la fase móvil óptima encontrada para la separación cromatográfica de las AHs utilizando una columna C_{18} .

En la Figura III.3.11 se muestran las eficiencias de elución, expresadas como áreas de pico, cuando se utiliza como eluyente BMIm-BF₄ 1 mM y diferentes porcentajes de acetonitrilo. Se puede observar que para bajos porcentajes de acetonitrilo, las aminas menos polares, A α C y MeA α C, no se eluyen. Para la mayoría de las aminas, las mayores áreas de pico se obtienen cuando se emplea un porcentaje del 50% de ACN, por lo que se eligió este porcentaje para experiencias posteriores.

La Figura III.3.12 recoge las eficiencias de elución cuando se emplean como eluyentes concentraciones del LI comprendidas entre 1 y 25 mM, manteniendo constante el porcentaje de acetonitrilo en el 50%. Tal y como puede observarse, para todas las aminas, excepto para MeA α C, las mayores áreas de pico se obtienen cuando se emplea una concentración de 10 mM de BMIm-BF₄ en el disolvente de elución.

Atendiendo a los resultados comentados se elige como composición de la mezcla de elución: 10 mM BMIm-BF₄ : acetonitrilo (1:1), fijándose el volumen de elución en 1 mL, ya que volúmenes superiores no mejoraban las recuperaciones de las aminas, comprendidas entre 85,7% para Trp-P-2 y 105,6% para MeA α C.

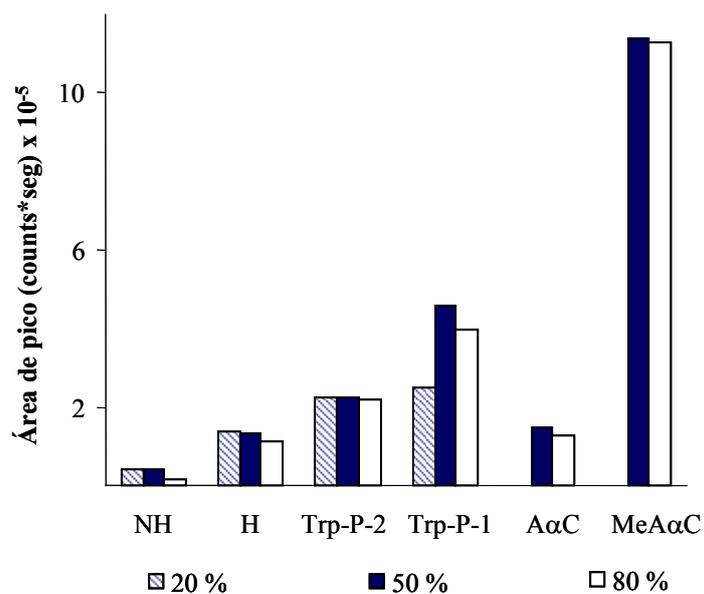


Figura III.3.11. Áreas de pico encontradas cuando se utiliza como eluyente en la etapa de SPE BMIm-BF₄ 1 mM y diferentes porcentajes de acetonitrilo.

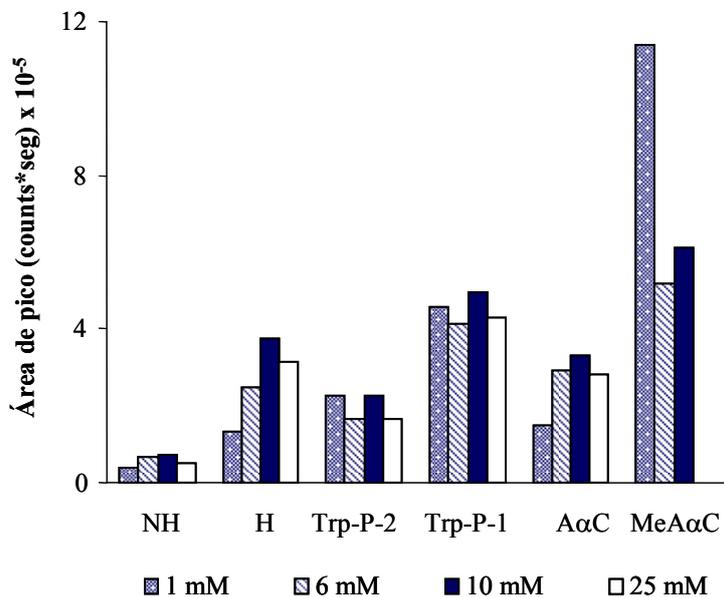


Figura III.3.12. Áreas de pico encontradas cuando se emplea un disolvente de elución compuesto por un 50% de ACN y diferentes concentraciones de BMIm-BF₄.

El método de extracción optimizado se aplicó a la determinación de seis AHs en dos clases de alimentos infantiles cárnicos: de ternera y de pollo. La Tabla III.3.8 muestra las eficiencias de extracción obtenidas así como la precisión del método cuando se analizan alimentos infantiles cárnicos por HPLC con detección electroquímica, usando LIs como aditivos a la fase móvil, y el método de extracción y preconcentración propuesto.

Tabla III.3.8. Eficiencias de extracción (% de recuperación) del método de extracción propuesto en muestras enriquecidas de alimentos infantiles cárnicos.

Compuesto	Recuperación (%) \pm SD ^a (ternera)	Recuperación (%) \pm SD ^a (pollo)
NH	47.5 \pm 1.9	41.2 \pm 5.0
H	69.5 \pm 2.6	46.9 \pm 1.2
Trp-P-2	66.0 \pm 6.3	61.1 \pm 3.6
Trp-P-1	79.1 \pm 16	55.3 \pm 3.7
A α C	69.4 \pm 2.5	88.8 \pm 7.0
MeA α C	80.8 \pm 4.7	59.9 \pm 4.9

^aDesviación estándar para 5 muestras

Debe destacarse que las recuperaciones obtenidas son comparables con las que se obtienen con matrices similares [141, 174, 188, 191]. Además, el método de extracción propuesto requiere menos etapas de *clean-up* que los descritos en la bibliografía y que siguen o modifican ligeramente el método desarrollado por Gross.

En general, se obtienen mayores recuperaciones para los alimentos infantiles de ternera, excepto para A α C. Las menores recuperaciones se encuentran para NH en ambos tipos de muestras. La precisión obtenida, expresada como desviación estándar relativa, varía entre 3.6% para A α C y 20.1% para Trp-P-1 en las muestras de alimentos infantiles de ternera, y entre 2.6% para H y 12.1% para NH en las muestras de alimentos infantiles de pollo.

Por último, se analizaron muestras de alimentos cárnicos infantiles de pollo y ternera sin enriquecer. Trp-P-1 fue la única amina detectada en las muestras de alimentos infantiles estudiados, pero no pudo ser cuantificada. En la Figura III.3.13 se muestran los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas de una muestra de alimento infantil de pollo enriquecido (A) y sin enriquecer (B).

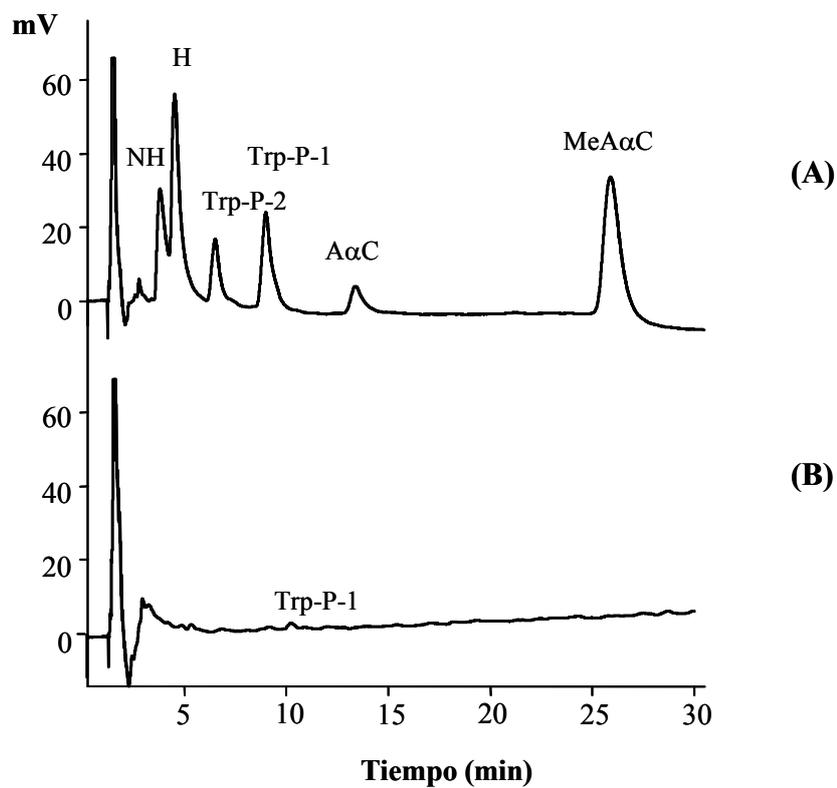


Figura III.3.13. Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas de (A) una muestra de alimento infantil de pollo enriquecida y (B) una muestra sin enriquecer.

III.4 Líquidos Iónicos como disolventes de desorción, supresores del efecto memoria y aditivos a la fase móvil en el acoplamiento SPME-HPLC con detección fluorescente para la determinación de AHs

En el Capítulo II de esta Tesis se han desarrollado métodos que combinan las ventajas de la microextracción en fase sólida con la HPLC para la determinación de un grupo de AHs, tanto con detección Vis-UV como fluorescente. Este acoplamiento dio lugar a métodos altamente selectivos y sensibles, adecuados para la determinación de las aminas en muestras de alimentos en las que estos compuestos se encuentran a niveles de traza. En esa ocasión, se optimizaron tanto la separación cromatográfica, utilizando TEA como aditivo a la fase móvil, como las condiciones adecuadas para llevar a cabo la etapa de SPME.

Debemos destacar que, con la metodología SPME-HPLC con detección fluorescente, los límites de detección obtenidos oscilaban entre 0.047 ng mL^{-1} para MeA α C y 0.190 ng mL^{-1} para PhIP. Sin embargo, a pesar de que los resultados con esta metodología son aceptables y comparables con los obtenidos por otros autores, los resultados obtenidos en el apartado III.2, indican que si empleamos LIs como aditivos a la fase móvil, entre otras ventajas, se obtienen límites de detección inferiores.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la microextracción en fase sólida puede presentar el inconveniente de que parte de los analitos extraídos pueden quedar retenidos en la fibra y desorberse en los sucesivos análisis. Este hecho puede suponer un problema cuando se utilizan detectores muy sensibles que permitan el análisis de bajas concentraciones de analito [192]. Para solventar este inconveniente se debe prestar especial atención tanto en la selección del disolvente de desorción como en el disolvente para lavar la fibra y la cámara después del paso de desorción.

Las aplicaciones más importantes y desarrolladas de los LIs están relacionadas con sus propiedades como disolventes. Los LIs tienen una naturaleza dual debido a su composición única anión-catión [25] y de esta manera pueden sustituir a disolventes orgánicos volátiles en muchas reacciones químicas y procesos de extracción [18, 26]. En este apartado, se pretende

desarrollar una nueva aplicación de los LIs, su utilización como disolvente de desorción en SPME-HPLC y como supresor del efecto memoria asociado a este acoplamiento.

La conjunción del uso de los LIs como aditivos a la fase móvil y como disolvente de desorción, permite conjugar las ventajas cromatográficas con las mayores eficiencias de desorción que pueden presentar los LIs, conduciendo a métodos SPME-HPLC más sensibles y reproducibles.

III.4.1 Separación cromatográfica

En el apartado III.2 se han descrito los beneficiosos efectos de los LIs como aditivos a la fase móvil en HPLC con detección fluorescente para la determinación de un grupo de AHs usando distintas fases estacionarias. Los resultados obtenidos permitieron establecer como condiciones óptimas para la separación de las aminas: una fase móvil compuesta por BMIm-BF₄ 1 mM, pH=3.6 y 18% (v/v) de acetonitrilo y la columna cromatográfica NovaPak®. Bajo estas condiciones el tiempo de análisis es de 30 minutos.

Con objeto de disminuir los tiempos de análisis, se estudió la posibilidad de llevar a cabo un gradiente de elución con una fase móvil binaria BMIm-BF₄ 1 mM, pH=3.6 (A)-acetonitrilo (B), en lugar de trabajar en modo isocrático como en los apartados anteriores. El gradiente propuesto es el siguiente, manteniendo el flujo a 1 mL·min⁻¹: 19% de B en A, desde el minuto 0 hasta el 13; luego se pasa del 19 al 30% de B en A desde los 13.01 hasta los 16 minutos; se mantiene el 30% de B en A desde los 16.01 minutos hasta el minuto 22, volviendo a las condiciones iniciales en cinco minutos y manteniéndose el sistema en estas condiciones durante 5 minutos más para su estabilización. La Figura III.4.1 muestra un cromatograma representativo en el que se pone de manifiesto que se alcanzan separaciones satisfactorias. Por otra parte, los estudios de reproducibilidad muestran que los tiempos de retención de las distintas aminas, presentan desviaciones estándar relativas comprendidas entre 0.78 y 1.7%.

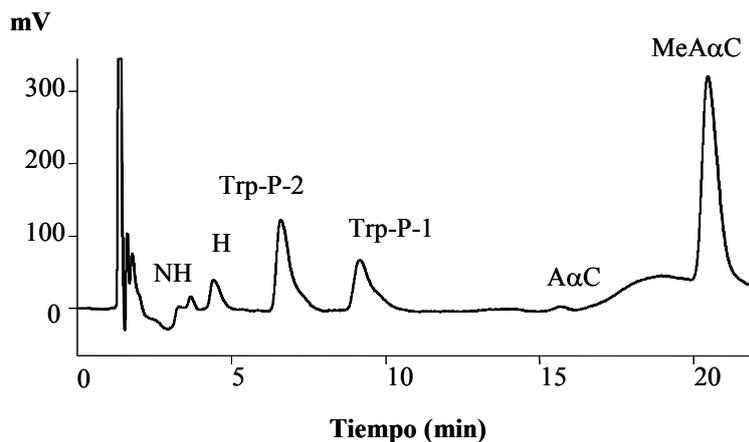


Figura III.4.1. Cromatograma correspondiente a una disolución de AHs con detección fluorescente y el gradiente de elución optimizado.

III.4.2 Optimización del proceso SPME-HPLC utilizando *BMIm-BF₄* como disolvente de desorción y supresor del efecto memoria

En el Capítulo II se ha aplicado con éxito la SPME acoplada con HPLC y detección fluorescente para determinar un grupo de AHs. Los parámetros que afectan al proceso de absorción en SPME, tiempo de absorción y porcentaje de metanol en las muestras, fueron optimizados. Por otra parte, el tiempo de desorción se fijó en 1 minuto y el metanol fue empleado como disolvente de desorción.

En este apartado se pretenden evaluar los beneficios asociados a la utilización del LI *BMIm-BF₄* como disolvente de desorción y para la eliminación del efecto memoria asociado a la SPME-HPLC con detección fluorescente. Los analitos considerados en este estudio han sido aquellas aminas que presentan fluorescencia natural: NH, H, Trp-P-2, Trp-P-1, AαC y MeAαC. En ese sentido, para la etapa de absorción en SPME se han elegido las condiciones experimentales optimizadas anteriormente: $t_{\text{abs}} = 30$ min y 2.5% de metanol en 0.05 M de NaOH como medio de extracción.

Optimización del proceso de desorción mediante diseños factoriales

Como primer paso en la optimización del proceso de desorción en SPME, se utilizaron diferentes disolventes: BMIm-BF₄ 1 mM, la mezcla BMIm-BF₄-metanol (8:2) y metanol, mediante la inyección de 0.5 mL de estos disolventes en la cámara de desorción. En todos los casos se empleó el modo de desorción estático, anteriormente establecido como el más adecuado para la desorción de las AHs. De la misma manera, en esta primera aproximación se tomó como tiempo de inmersión, tiempo durante el cual la fibra se mantiene sumergida en el disolvente en el interior de la cámara, 9 minutos, tiempo utilizado cuando se empleaba metanol como disolvente de desorción.

Los resultados obtenidos mostraron que las aminas seguían el comportamiento esperado, es decir, a medida que disminuye la polaridad del disolvente de desorción aumenta la eficiencia de la desorción de las aminas menos polares, así BMIm-BF₄ 1 mM dio lugar a la mayor eficiencia de desorción para las aminas NH y H. Por otra parte, el metanol mostró la mayor eficiencia para las aminas menos polares, A α C y MeA α C, mientras que Trp-P-2 y Trp-P-1 presentaron un comportamiento intermedio, mostrando las mayores eficiencias con la mezcla BMIm-BF₄ 1 mM : metanol (8:2). La Figura III.4.2 muestra el efecto de estos disolventes en las eficiencias de desorción para H, Trp-P-2 y MeA α C como ejemplos representativos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es necesario optimizar la composición de una mezcla compuesta por BMIm-BF₄ y metanol con objeto de obtener las mejores eficiencias de desorción para todos los compuestos. Por otra parte, las eficiencias de desorción no dependen sólo del disolvente elegido, sino también del tiempo en el cual la fibra permanezca sumergida en el interior de la cámara, tiempo de inmersión (t_{imm}).

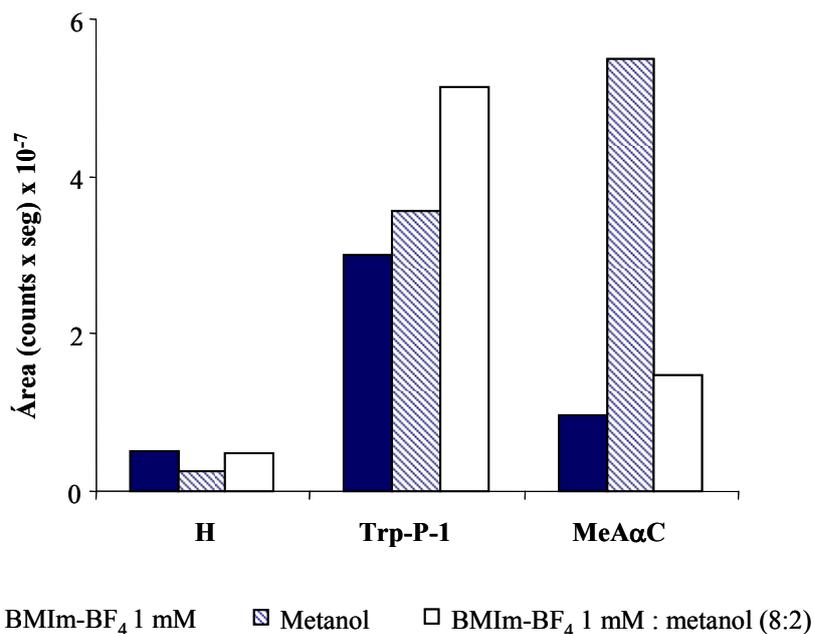


Figura III.4.2. Eficiencias de desorción para las aminas H, Trp-P-1 y MeA α C cuando se emplean los disolventes de desorción indicados.

Por lo tanto, las variables a optimizar en la etapa de desorción en la nueva metodología SPME-HPLC son: la composición del disolvente de desorción (porcentaje de metanol y concentración de BMIm-BF₄) y el tiempo durante el cual la fibra se mantiene sumergida en este disolvente en el interior de la cámara (t_{imm}).

Como se ha venido indicando a lo largo de toda esta Tesis, el uso de diseños factoriales para encontrar los valores más adecuados de las variables que afectan al paso de la desorción en SPME, permite una consideración global del número de experimentos a realizar y de los posibles efectos de interacción entre las variables seleccionadas. La aplicación de una aproximación estadística, como es el diseño factorial, permite disminuir el tiempo de puesta a punto del método, así como proporcionar datos menos ambiguos.

Como primer paso para la optimización, elegimos un diseño factorial completo de dos niveles y tres variables, 2^3 , que da lugar a 8 experiencias, más dos puntos centrales para evaluar la precisión y la validez estadística de los resultados. Este diseño es muy útil debido a que con pocas experiencias es posible detectar aquellas variables que resultan más significativas. Los niveles máximo y mínimo de cada factor fueron elegidos de acuerdo a los

datos obtenidos en experiencias previas: 10 y 90% de metanol en el disolvente de desorción (Factor A); 1 y 25 mM de BMIm-BF₄ en el disolvente de desorción (Factor B); y 3 y 15 minutos para el tiempo de inmersión (Factor C). El área de pico fue elegida como respuesta. La Tabla III.4.1 muestra la matriz del diseño factorial.

Tabla III.4.1. Matriz del diseño factorial (2³).

Experiencia	% Metanol	[BMIm-BF ₄] (mM)	t _{imm} (min)
1	90	25	3
2	10	1	3
3	50	13	9
4	10	1	15
5	90	1	3
6	90	25	15
7	10	25	15
8	50	13	9
9	10	25	3
10	90	1	15

Los resultados obtenidos a partir del diseño factorial indican que las seis AHs estudiadas pueden clasificarse en tres grupos atendiendo a su comportamiento frente a los tres factores considerados: un grupo está constituido por NH y H; Trp-P-2 y Trp-P-1 forman el segundo grupo y el tercer grupo lo constituyen AαC y MeAαC.

Los efectos de los factores principales, mostrados en la Figura III.4.3 (A), ponen de manifiesto que la concentración de BMIm-BF₄ en el disolvente de desorción tiene siempre un efecto positivo en la respuesta de todas las aminas, mientras que el tiempo de inmersión tiene un efecto positivo solamente para NH y H. Por su parte, el porcentaje de metanol tiene un efecto negativo para todas las aminas, excepto para AαC y MeAαC. En la Figura III.4.3 (B) se muestran las interacciones entre los factores. Como puede observarse, existe una interacción entre la concentración de BMIm-BF₄ y el tiempo de inmersión para las aminas Trp-P-2, Trp-P-1, AαC y MeAαC. Para NH, H, Trp-P-2 y Trp-P-1 la respuesta alcanza su valor máximo cuando el tiempo de inmersión está en su nivel más alto y el porcentaje de metanol en el nivel más bajo. Sin embargo, las aminas menos polares, AαC y MeAαC,

presentan un comportamiento opuesto. En todos los casos, la concentración óptima de BMIm-BF₄ en el disolvente de desorción es de 25 mM, fijándose esta concentración para estudios posteriores.

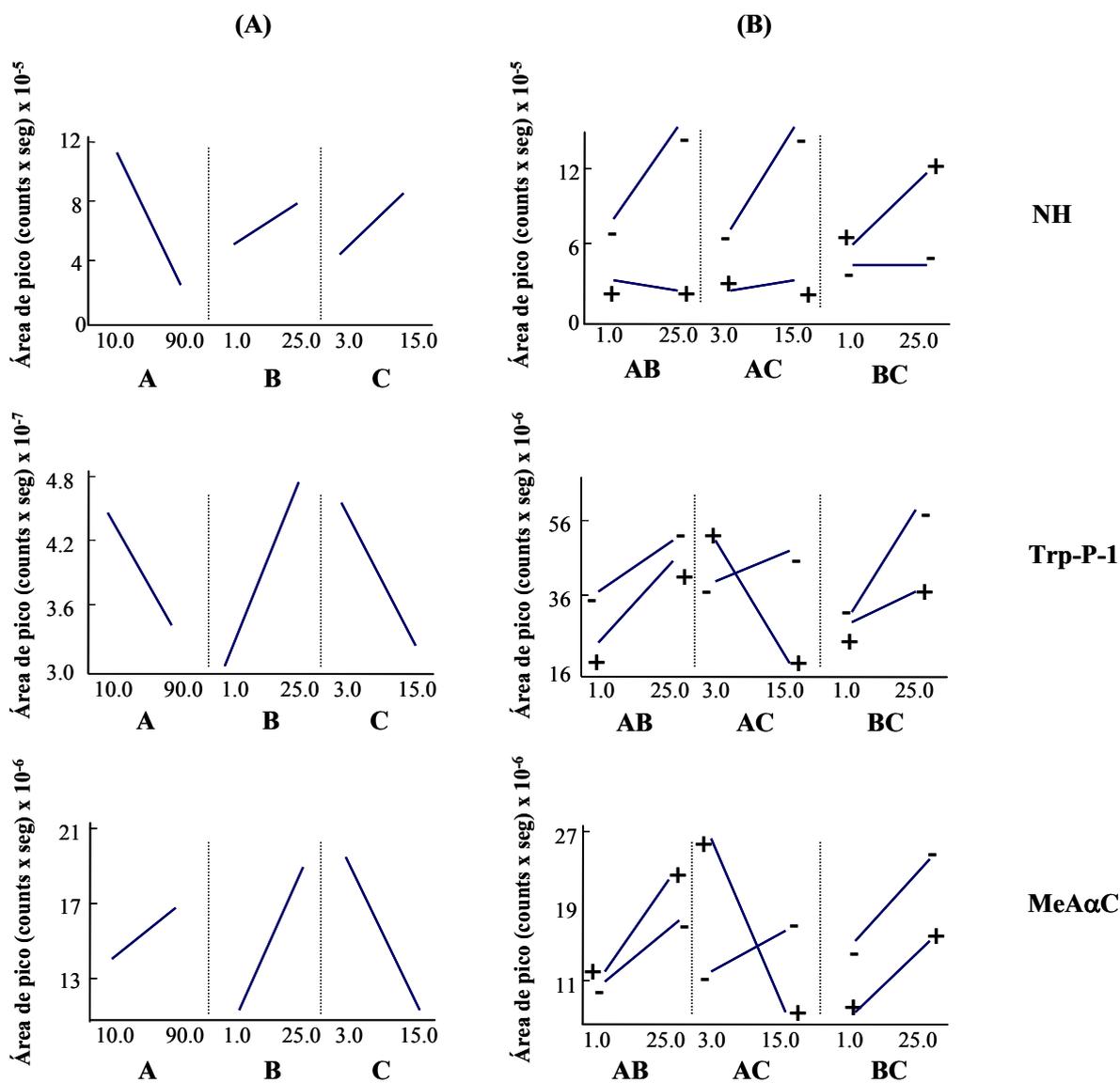


Figura III.4.3. Efectos de los factores principales (A) y sus interacciones (B) para las aminas NH, Trp-P-1 y MeAcC como ejemplos representativos de cada grupo, donde: A, % de metanol; B, concentración de BMIm-BF₄ y C, tiempo de inmersión.

Con objeto de optimizar las variables que tienen una influencia significativa, el tiempo de inmersión y el porcentaje de metanol en el disolvente de desorción, se ha llevado a cabo un diseño Doehlert con dos puntos centrales. Para dos variables, el diseño Doehlert consiste en un punto central y seis puntos formando un hexágono regular y por lo tanto, situado en un círculo [193, 194]. Para obtener más información sobre el sistema, se eligieron cinco niveles para el tiempo de inmersión, variable con un efecto mayor. Este diseño da lugar a nueve experiencias, que se muestran en la Tabla III.4.2.

Tabla III.4.2. Matriz del diseño Doehlert.

Experiencia	Código de valores		Valores experimentales ^a	
	X ₁	X ₂	t _{inm} (min)	% Metanol
1	0	0	12	50
2	1	0	21	50
3	0.5	0.866	16.5	84.6
4	0	0	12	50
5	-1	0	3	50
6	-0.5	-0.866	7.5	15.4
7	0.5	-0.866	16.5	15.4
8	-0.5	0.866	7.5	84.6
9	0	0	12	50

^aLos valores experimentales (U_i) fueron calculados como $U_i = U_{0i} + X_i \Delta U_i$, donde U_{0i} es el valor central, X_i es el valor codificado y ΔU_i es el rango [195].

La realización de las nueve experiencias indicadas en la matriz del diseño permiten la estimación de los coeficientes (b) de un modelo polinomial de segundo grado, como se indica en la siguiente ecuación:

$$SR = b_0 + b_1[t_{inm}] + b_2[\% \text{ Metanol}] + b_{11}[t_{inm}]^2 + b_{22}[\% \text{ Metanol}]^2 + b_{12} [t_{inm}][\% \text{ Metanol}]$$

Los valores de los coeficientes obtenidos para cada amina y los valores óptimos para cada factor se muestran en la Tabla III.4.3. Los valores negativos de los coeficientes

correspondientes a la interacción entre los factores sugieren que esta interacción disminuye las áreas de los picos para todas las aminas.

En la Figura III.4.4 se muestran las superficies de respuesta obtenidas para todas las aminas. Los valores óptimos para el tiempo de inmersión y el porcentaje de metanol varían entre 3.0 y 21.0 minutos y 16.2 y 87.3%, respectivamente, tal y como se indica en la Tabla III.4.3.

A partir de los resultados obtenidos, se puede deducir que debido a que las aminas pueden agruparse en dos grupos diferentes, atendiendo a su comportamiento frente a las variables estudiadas, se debe llegar a una situación de compromiso a la hora de elegir los valores óptimos para el tiempo de inmersión y el porcentaje de metanol. NH y H presentan los tiempos de inmersión óptimos más altos y, para las otras aminas, la media de los tiempos óptimos obtenidos a partir del diseño experimental Doehlert es de 4 minutos aproximadamente. Teniendo en cuenta que NH y H presentan menor dependencia con el tiempo de inmersión, si tomamos el tiempo óptimo en 4 minutos, esto implicaría disminuciones del 17.9 y el 25.1% en las respuestas de NH y H, respectivamente. Por lo tanto, y asumiendo que estas disminuciones son aceptables, este tiempo de 4 minutos fue adoptado como óptimo para todas las aminas. Por otra parte, considerando la baja sensibilidad de la A α C, el porcentaje de metanol en el disolvente de desorción fue fijado al 60%.

Tabla III.4.3. Valores de los coeficientes del modelo polinomial, coeficientes de regresión múltiple y valores óptimos de los tiempos de inmersión y porcentajes de metanol para cada amina de acuerdo con el modelo descrito.

Coefficientes	NH	H	Trp-P-2	Trp-P-1	AαC	MeAαC
$b_0 \times 10^{-6}$	1.36	1.29	-3.27	-9.93	-2.07	-9.66
$b_1 \times 10^{-5}$	0.136	3.05	11.7	28.0	3.30	12.0
$b_2 \times 10^{-5}$	0.294	1.44	5.35	12.4	1.15	5.83
$b_{11} \times 10^{-4}$	0.087	-0.530	-1.94	-3.62	-0.710	-1.71
$b_{22} \times 10^{-3}$	-0.394	-1.44	-3.51	-6.49	-0.731	-3.51
$b_{12} \times 10^{-3}$	-0.791	-3.99	-17.2	-50.3	-3.67	-18.5
R	0.995	0.988	0.877	0.858	0.829	0.813
$(t_{\text{imm}})_{\text{óptimo}}$	21.0	20.8	3.0	3.0	8.06	3.0
$(\% \text{ Metanol})_{\text{óptimo}}$	16.2	21.1	67.9	83.7	58.5	75.1
Disminución en la respuesta óptima (%)	25.7	18.0	10.9	9.42	3.67	6.10

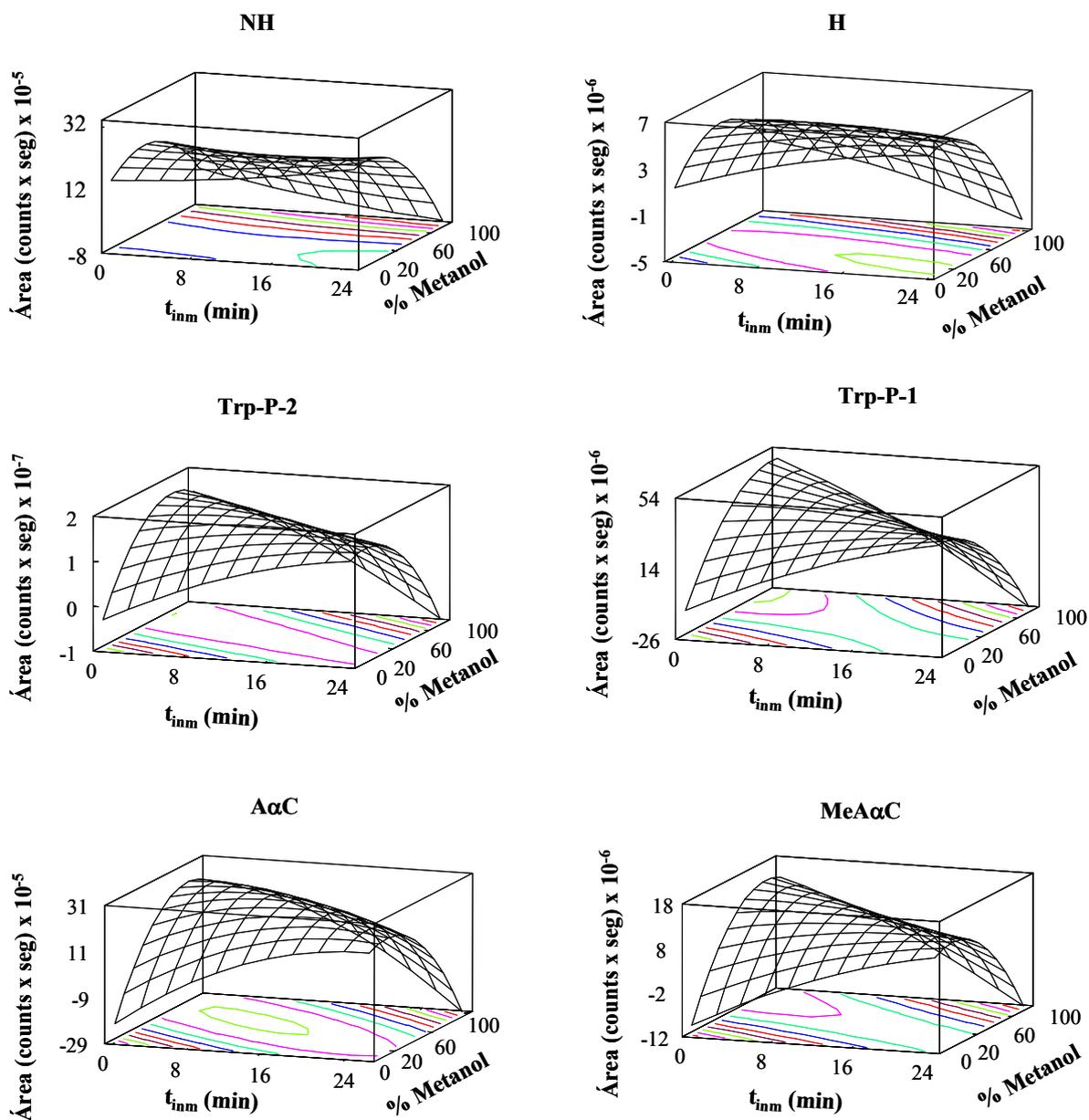


Figura III.4.4. Superficies de respuesta obtenidas a partir del diseño Doehlert para todas las AHs estudiadas.

Supresión del efecto memoria

Como se ha comentado anteriormente, el efecto memoria en la SPME puede llegar a ser un problema cuando la concentración de los analitos en la muestra siguiente es más baja que la concentración debida al efecto memoria procedente del análisis realizado previamente [195, 196]. Por esta razón, el efecto memoria debe ser estudiado para determinar la composición de la disolución de lavado y el número de lavados necesarios para eliminar este efecto y suprimir los resultados erróneos en los análisis sucesivos.

Atendiendo a las buenas propiedades que como disolventes presentan los LIs, especialmente el BMIm-BF₄, y a que este LI es utilizado en la composición del disolvente de desorción con muy buenos resultados, estudiamos como posibles disolventes de lavado una mezcla BMIm-BF₄ 25 mM : metanol (4:6) (disolvente de desorción optimizado previamente) y metanol, utilizando 4 minutos como tiempo de inmersión. La Tabla III.4.4 muestra el efecto memoria expresado como el porcentaje del área de pico inicial obtenido para cada amina después de realizar el número de lavados indicado. Algunos autores [192] definen la ausencia del efecto memoria cuando este porcentaje de área inicial es inferior al 0.1%.

En esta Tabla III.4.4 se ha incluido el efecto memoria obtenido con metanol como disolvente de desorción y de lavado, estudiado previamente en el Capítulo II, para su comparación con el LI como disolvente de lavado.

Los resultados obtenidos muestran que cuando se utiliza metanol, tanto como disolvente de desorción como de lavado, y se emplean 9 minutos como tiempo de inmersión, se necesitan más de 4 lavados para eliminar el efecto memoria (< 0.1%). Cuando se emplea la mezcla BMIm-BF₄ 25 mM : metanol y 4 minutos como tiempo de inmersión, el efecto memoria después de la extracción y sin hacer ningún lavado, es mayor que cuando se emplea metanol, y oscila entre el 9 y el 40%. Sin embargo, después de tres lavados, tanto con la mezcla BMIm-BF₄ : metanol como con metanol, no se encontró efecto memoria para ninguna amina.

Tabla III.4.4. Efecto memoria expresado como el porcentaje de área de pico inicial en las condiciones indicadas en cada caso.

Compuesto	(A)				(B)				(C)			
	0	2	3	4	0	1	2	3	0	1	2	3
NH	0.616	-	-	-	9.10	-	-	-	9.10	-	-	-
H	1.24	0.644	0.571	0.418	17.7	9.20	3.60	-	17.7	-	-	-
Trp-P-2	10.2	1.42	0.633	0.323	21.7	3.36	1.02	-	21.7	2.54	1.00	-
Trp-P-1	13.2	2.19	0.473	0.246	14.0	2.26	0.887	-	14.0	0.521	-	-
A α C	2.12	0.239	0.139	0.107	-	-	-	-	-	-	-	-
MeA α C	1.95	0.483	0.384	0.220	40.7	8.31	0.707	-	40.7	3.92	0.547	-

(-) No existe efecto memoria (< 0.1%) [193]

(A) Disolvente de desorción: metanol. Disolvente de lavado: metanol. $t_{imm} = 9$ minutos.

(B) Disolvente de desorción: BMIm-BF₄ 25 mM : metanol (4:6). Disolvente de lavado: BMIm-BF₄ 25 mM : metanol (4:6). $t_{imm} = 4$ minutos.

(C) Disolvente de desorción: BMIm-BF₄ 25 mM : metanol (4:6). Disolvente de lavado: metanol. $t_{imm} = 4$ minutos.

De acuerdo con estos resultados, podemos afirmar que la mezcla del líquido iónico y metanol puede ser un supresor del efecto memoria tan eficaz como el metanol, encontrándose así otra aplicación de los LIs que hasta ahora no había sido explorada. Por lo tanto, se recomienda que la fibra y la cámara de desorción sean lavadas por inyección de tres porciones de 250 μL de 25 mM BMIm-BF₄ : metanol (4:6) para eliminar el efecto memoria.

III.4.3 Características analíticas del método SPME-HPLC optimizado

Al igual que para otros métodos analíticos, es necesario conocer los parámetros de calidad del método SPME-HPLC optimizado, entre los cuales destacan: el rango de linealidad, el límite de detección y precisión de las determinaciones. Para ello se empleó BMIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil y el gradiente de elución optimizado en el Apartado III.4.1 para la separación de las AHs. La Tabla III.4.5 muestra los parámetros de calidad del método cromatográfico.

Las curvas analíticas se establecieron a partir de disoluciones que contenían concentraciones de AHs en los rangos comprendidos entre 6.10 y 696 ng L^{-1} . En general, tal y como puede observarse en la Tabla, se observa una buena linealidad, con coeficientes de correlación superiores a 0.992 en todos los casos.

Los límites de detección (LD) del método SPME-HPLC se calcularon como tres veces la desviación estándar obtenida a partir del análisis de tres réplicas de una disolución de estándares de las AHs de baja concentración. Los LD oscilan entre 0.30 ng L^{-1} para MeA α C y 75 ng L^{-1} para A α C. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el apartado II.3.2, se puede observar que los LD obtenidos empleando BMIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil y una mezcla de este LI y metanol como disolvente de desorción, son inferiores a los que se obtienen con metanol como disolvente de desorción y TEA como aditivo a la fase móvil. En la mayoría de los casos, los LD obtenidos con este método son, al menos, diez veces inferiores. Esta disminución en los LD puede atribuirse a la conjunción de dos efectos. Por una parte, cuando se emplea solamente BMIm-BF₄ 1 mM como aditivo a la fase móvil, las alturas de los picos son mayores que cuando se emplea TEA 10 mM. Por otra parte, si este LI se usa como disolvente de desorción, las eficiencias de desorción son ser mayores que las obtenidas cuando se emplea solamente metanol como disolvente de desorción.

Tabla III.4.5. Parámetros de calidad del método analítico.

Compuesto	Rango de linealidad (ng L ⁻¹)	(Pendiente ± SD) x 10 ⁻⁶	R	S _{y/x}	LD (ng L ⁻¹)	RSD (%) ^a
NH	19.8 – 696	1.10 ± 0.02	0.998	16371	7.4	6.55 (198)
H	6.70 – 235	14.5 ± 0.4	0.996	106784	6.1	1.34 (67.0)
Trp-P-2	6.10 – 182	16.3 ± 0.2	0.999	29716	3.5	11.1 (61.0)
Trp-P-1	6.40 – 192	11.5 ± 0.2	0.998	49792	2.1	7.34 (64.0)
AαC	92.0 – 644	0.30 ± 0.02	0.992	5485	75	9.81 (184)
MeAαC	16.0 – 480	62 ± 2	0.995	976284	0.30	6.28 (160)

^a 3 extracciones en tres días consecutivos. Los valores entre paréntesis se corresponden con la concentración utilizada (ng·mL⁻¹)

La precisión del método se evaluó llevando a cabo tres extracciones durante tres días consecutivos a los niveles de concentración indicados en la Tabla III.4.5. Las desviaciones estándar relativas, RSD (%) oscilan entre 1.34% para H y 11.1% para Trp-P-2. Además, el análisis de la varianza de un factor indica que no existen diferencias significativas, para un nivel de significación del 0.05, entre los resultados obtenidos en los diferentes días para todas las aminos. Estos valores de RSD (%) son comparables con los que se obtienen cuando se emplea metanol como disolvente de desorción y TEA como aditivo a la fase móvil (apartado II.3.2), destacándose que en el método que nos ocupa las concentraciones utilizadas para todas las AHs son, al menos, diez veces menores.

III.4.4 Aplicación en muestras de alimentos

Para evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se llevaron a cabo estudios de recuperación en muestras de extractos de carne comerciales (granulado de caldo de carne) enriquecidos con una determinada concentración de AHs (ver apartado IV.4.1 de la Parte Experimental). Las muestras se trataron tal y como se explica en el apartado IV.4.3 de la Parte Experimental. La Tabla III.4.6 recoge las recuperaciones medias y las desviaciones estándar obtenidas. Como puede observarse, las recuperaciones medias se encuentran entre 118% para Trp-P-1 y 68.5% para MeA α C, siendo superiores al 100% para todas las aminos excepto para MeA α C.

Finalmente, el método fue aplicado a la determinación de AHs en muestras de extractos de carne sin enriquecer. La Tabla III.4.7 muestra los niveles de las aminos encontradas en las muestras analizadas.

Tabla III.4.6. Recuperaciones en extractos de carne enriquecidos.

Compuesto	Concentración (ng g ⁻¹)	Recuperación (%) ± SD ^a
NH	23.8	104 ± 7
H	8.06	116 ± 10
Trp-P-2	7.30	99.6 ± 2.1
Trp-P-1	7.68	118 ± 13
AαC	22.1	111 ± 19
MeAαC	19.2	68.5 ± 1.9

^aDesviación estándar para tres muestras.

Tabla III.4.7. Concentraciones de las aminas en las muestras estudiadas

Compuesto	Granulado de caldo de carne (ng g ⁻¹)
NH	52.2 ± 8.0
H	40.2 ± 1.5
Trp-P-2	0.46 ± 0.09
Trp-P-1	2.2 ± 0.6
AαC	d. / n. c.
MeAαC	d. / n. c.

d. Detectado

n. c. No cuantificado

Como puede observarse, los valores más altos se obtienen para NH y H, 52.2 y 40.2 ng g⁻¹, respectivamente. Tanto en los diferentes tipos de muestras que hemos analizado en la realización de esta Tesis, como en los trabajos encontrados en la bibliografía, estas dos aminas son las que se encuentran en mayor cantidad en las muestras de alimentos cárnicos

cocinados. Las otras aminos cuantificadas fueron Trp-P-2 y Trp-P-1, aunque en cantidades mucho menores que NH y H. Las aminos $A\alpha C$ y $MeA\alpha C$ fueron detectadas en las muestras pero no pudieron ser cuantificadas debido a la presencia de interferencias que coeluyen conjuntamente con estas aminos. En la Figura III.4.5 se muestra el cromatograma de una muestra granulada de caldo de carne sin enriquecer donde puede observarse la coelución indicada para $A\alpha C$.

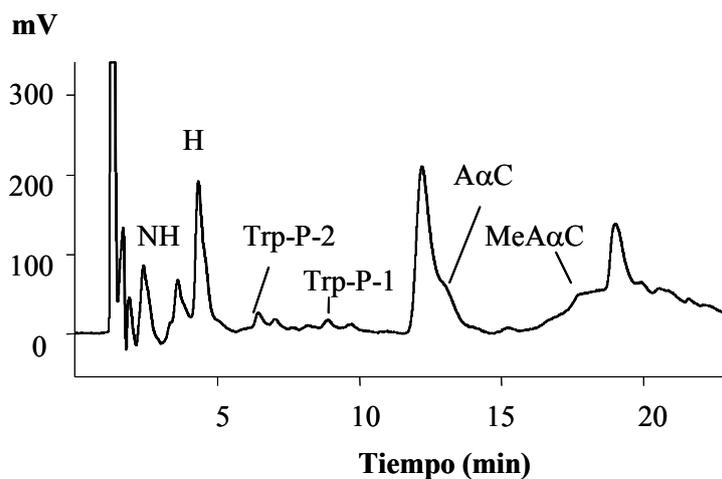


Figura III.4.5 Cromatograma de una muestra de granulada de caldo de carne sin enriquecer de acuerdo con las condiciones óptimas.

III.5 Bibliografía

- [1] P. Wassercheid, W. Keim, *Angew. Chem. Int. Ed.* 39 (2000) 3772-3789.
- [2] R. Marcilla, D. Mecerreyes. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* Octubre-Diciembre (2005) 22-28.
- [3] A. Berthod, S. Carda-Broch. *Cromatografía y Técnicas afines* 24 (2003) 36-44.
- [4] D. Appleby, C.L. Hussey, K.R. Seddon, J.E. Turp. *Nature* 323 (1986) 614-616.
- [5] K.R. Seddon. *Kinet. Catal.* 37 (1996) 693-697.
- [6] N.J. Earle, K.R. Seddon. *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391-1398.
- [7] J.A. Boon, J.A. Levisky, J.L. Pflug, J.S. Wilkes. *J. Org. Chem.* 51 (1986) 480-483.
- [8] Y. Cauvin, B. Gilbert, I. Guibard. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1990) 1715-1718.
- [9] S. Studzinska, B. Buszewski. *Anal. Bioanal. Chem.* 303 (2009) 983-990.
- [10] D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang. *Clean* 35(1) (2007) 42-48.
- [11] P. Wasserscheid, R. van Hal, A. Bosmann. *Green Chem.* 4 (2002) 400-404.
- [12] K.N. Marsh, J.A. Boxall, R. Lichtenthaler. *Fluid Phase Equilibria* 219 (2004) 93-98.
- [13] C. Chiappe, D. Pieraccini. *J. Phys. Org. Chem.* 18 (2005) 275-297.
- [14] H.G. Joglekar, I. Rahman, B.D. Kulkarni. *Chem. Eng. Technol.* 30 (2007) 819-828.
- [15] M.J. Muldoon, C.M. Gordon, I.R. Dunkin. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2001) 433-435.
- [16] S. Park, R.J. Kazlauskas. *J. Org. Chem.* 66 (2001) 8395-8401.
- [17] A. Berthod, "Centrifugal Partition Chromatography" (A.P. Foucault Ed.) M Dekker NY Chromatogr. Sci. Ser. 68 (1995) 167-197.
- [18] S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong. *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 191-199.
- [19] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch. *J. Chromatogr. A.* 1184 (2007) 6-18.
- [20] Y. Chauvin, H. Olivier-Bourbigou. *Chemtechnology* 25 (1995) 26-30.
- [21] W.H. Awad, J.W. Gilman, M. Nyden, R.H. Harris, T.E. Sutto, J.H. Callahan, P.C. Trulove, H.C. DeLong, D.M. Fox. *Termochim. Acta* 409 (2004) 3-11.

- [22] C. Yao, J.L. Anderson. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1658-1712.
- [23] M. Kosmulski, J. Gustafsson, J.B. Rosenholm. *Thermochim. Acta* 412 (2004) 47-53.
- [24] B. Buszewski, S. Studzinska. *Chromatographia* 68 (2008) 1-10.
- [25] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Huguet. *Anal. Chem.* 77 (2005) 4071-4080.
- [26] C. Poole. *J. Chromatogr. A* 1037 (2004) 49-82.
- [27] P. Wasserscheid, T. Welton, Eds. Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2003.
- [28] S.Y. Lee, H.H. Yong, Y.J. Lee, S.K. Kim, S. Ahn. *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 13663-13667.
- [29] H. Sakaebe, H. Matsumoto. *Electrochem. Commun.* 5 (2003) 594-598.
- [30] T. Sato, G. Masuda, K. Takagi. *Electrochem. Acta* 49 (2004) 3603-3611.
- [31] J.F. Liu, J.F. Peng, Y.G. Chi, G.B. Jiang. *Talanta* 65 (2005) 705-709.
- [32] F. D'Anna, V. Frenna, R. Noto, V. Pace, D. Spinelli. *J. Org. Chem.* 70 (2005) 2828-2831.
- [33] J. Ross, J. Xiao. *Green Chem.* 4 (2002) 129-133.
- [34] R.A. Sheldon, R.M. Lau, M.J. Sorgedraeger, F. Van Rantwijk, K.R. Sheldon. *Green Chem.* 4 (2002) 147-151.
- [35] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S.M.S. Chauhan. *Tetrahedron* 61 (2005) 1015-1060.
- [36] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra. *Biotechnol. Lett.* 23 (2001) 1529-1533.
- [37] J.F. Brennecke, E.J. Maginn. *AIChE J.* 47 (2001) 2384-2389.
- [38] J.L. Anthony, S.N.V.K. Aki, E.J. Maginn, J.F. Brennecke. *Int. J. Environ. Technol. Manage.* 4 (2004) 105-115.
- [39] H. Zhao, S. Xia, P. Ma. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80 (2005) 1089-1096.
- [40] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, M.A.M. Reis, J.G. Crespo. *J. Membrane Sci.* 242 (2004) 197-209.
- [41] M. Matsumoto, Y. Inomoto, K. Kondo. *J. Membrane Sci.* 246 (2005) 77-81.
- [42] C. Basheer, A.A. Alnedhary, B.S.M. Rao, R. Balasubramanian, H.K. Lee. *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 19-24.
- [43] E.M. Martinis, R.A. Olsina, J.C. Altamirano, R.G. Wuilloud. *Anal. Chim. Acta* 628 (2008) 41-48.
- [44] J. Fan, Y. Fan, Y. Pei, K. Wu, J. Wang, M. Fan. *Sep. Pur. Technol.* 61 (2008) 324-331.

- [45] G. Absalan, M. Akhond, L. Sheikhan. *Talanta* 77 (2008) 407–411.
- [46] H.X. Shan, Z.J. Li, M. Li. *Microchim. Acta* 159 (2007) 95–100.
- [47] M.P. Jensen, J.A. Dzielawa, P. Rickert, M.L. Dietz. *J Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 10664–10665.
- [48] A.E. Visser, R.P. Swatloski, W.M. Reichert, R. Mayton, S. Sheff, A. Wierzbicki, J.H. Davis Jr, R.D. Rogers. *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 2523-2529.
- [49] A.E. Visser, R.P. Swatloski, S.T. Griffin, D.H. Hartman, R.D. Rogers. *Sep. Sci. Technol.* 36 (2001) 785-804.
- [50] K. Shimojo, M. Goto. *Anal. Chem.* 76 (2004) 5039-5044.
- [51] S. Vidal, M.J. Neiva Correia, M.M. Marques, M.R. Ismael, M.T. Angelino-Reis. *Sep. Sci. Technol.* 39 (2004) 2155-2169.
- [52] G.-T. Wei, Z. Yang, C.-J. Chen. *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 183-192.
- [53] F. Xinmei, D. Shugui, Z. Yu. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 86(13) (2006) 985-993.
- [54] K. Nakashima, F. Kubota, T. Maruyama, M. Goto. *Anal. Sci.* 19 (2003) 1097-1098.
- [55] S.V. Smirnova, I.I. Totocheshnikova, A.A. Formanovsky, I.V. Pletnev. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1369-1375.
- [56] A.G. Fadeev, M.M. Meagher. *Chem. Commun.* (2001) 295-296.
- [57] Y.-P. Tzeng, C.-W. Shen, T. Yu. *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 1–6.
- [58] Z. Li, Q. Wei, R. Yuan, X. Zhou, H. Liu, H. Shan, Q. Song. *Talanta* 71 (2007) 68–72.
- [59] Z.J. Li, N.P. Lu, X. Zhou, Q.J. Song. *J. Pharmaceut. Biomed.* 43 (2007) 1609–1614.
- [60] D.-H. Cheng, X.-W. Chen, Y. Shu, J.-H. Wang. *Talanta* 75 (2008) 1270–1278.
- [61] H. Luo, S. Dai, P.V. Bonnesen, A.C.I. Buchanan, J.D. Holbrey, N.J. Bridges, R.D. Rogers. *Anal. Chem.* 76 (2004) 3078-3083.
- [62] F. Zhao, S. Lu, W. Du, B. Zeng. *Microchim. Acta* 165 (2009) 29-33.
- [63] L. Vidal, A. Canals, N. Kalogerakis, E. Psillakis. *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 25-30.
- [64] L.M. Zhao, L.Y. Zhu, H.K. Lee. *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 239-248.
- [65] J. Peng, J. Lu, X. Hu, J. Liu. *Microchim. Acta* 158 (2006) 181-186.
- [66] J.-F. Liu, G.-B. Jiang, Y.-G. Chi, Y.-Q. Cai, P.-X. Zhou, J.-T. Hu. *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870-5876.

- [67] J.F. Liu, Y.G. Chi, G.B. Jiang, C. Tai, J.F. Peng. *J. Chromatogr. A* 1026 (2004) 143-147.
- [68] C.L. Ye, Q.X. Zhou, X.M. Wang. *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 165-171.
- [69] L. Vidal, E.P. Sillakis, C.E. Domini, N. Grane, F. Marken, A. Canals. *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 189-195.
- [70] C.L. Ye, Q.X. Zhou, X.M. Wang, J.P. Xiao. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 42-47.
- [71] J.F. Peng, J.F. Liu, G.B. Jiang, C. Tai, M.J. Huang. *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 3-6.
- [72] E. Aguilera-Heirador, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel. *Anal. Chem.* 80 (2008) 793-800.
- [73] Z. Miskolczy, K. Sebók-Nagy, L. Biczók, S. Göktürk. *Chem. Phys. Lett.* 400 (2004) 296-300.
- [74] J. Bowers, C.P. Butts, P.J. Martin, M.C. Vergara-Gutierrez, R.K. Heenan. *Langmuir* 20 (2004) 2191-2198.
- [75] A. Modaressi, H. Sifaoui, M. Mielcarz, U. Domanska, M. Rogalski. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 302 (2007) 181-185.
- [76] Q.Q. Baltazar, J. Chandawalla, K. Sawyer, J.L. Anderson. *Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 302 (2007) 150-156.
- [77] L. Guerra-Abreu, V. Pino, J.L. Anderson, A.M. Afonso. *J. Chromatogr. A* 1241 (2008) 23-29.
- [78] S. Dadfarnia, A. Mohammad, H. Shabani, M.S. Bidabadi, A.A. Jafari. *J. Hazard. Mater.* 173 (2009) 534-538.
- [79] J.L. Manzoori, M. Amjadi, J. Abulhassani. *Anal. Chim. Acta* 644 (2009) 48-52.
- [80] J.L. Manzoori, M. Amjadi, J. Abulhassani. *Talanta* 77 (2009) 1539-1544.
- [81] L. Xia, X. Li, Y. Wu, B. Hu, R. Chen. *Spectrochimica Acta Part B* 63 (2008) 1290-1296.
- [82] A. Chisvert, I.P. Román, L. Vidal, A. Canals. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1290-1295.
- [83] L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals, A. Salvador. *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 95-103.
- [84] M. Baghdadi, F. Shemirani. *Anal. Chim. Acta* 634 (2009) 186-191.
- [85] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel. *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 106-111.
- [86] S. Li, S. Cai, W. Hu, H. Chen, H. Liu. *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 666-671.
- [87] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6356-6364.
- [88] Q. Zhou, H. Bai, G. Xie, J. Xiao. *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 148-153.
- [89] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 885-891.

- [90] L.M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M. Asensio-Ramos, M.A. Rodríguez-Delgado. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7336-7345.
- [91] H. Abdolmohammad-Zadeh, G.H. Sadeghi. *Anal. Chim. Acta* 649 (2009) 211–217.
- [92] F.-Y. Du, X.-H. Xiao, X.-J. Luo, G.-K. Li. *Talanta* 78 (2009) 1177–1184.
- [93] V. Pino, J.L. Anderson, J. H. Ayala, V. González, A.M. Afonso. *J. Chromatogr. A* 1182 (2008) 145–152.
- [94] F.-Y. Du, X.-H. Xiao, G.-K. Li. *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 56–62.
- [95] Y.N. Hsieh, P.C. Huang, I.W. Sun, T.J. Whang, C.Y. Hsu, H.H. Huang, C.H. Kuei. *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 321-328.
- [96] P. Yang, C.W. Lau, X. Liu, J.Z. Lu. *Anal. Chem.* 79 (2007) 8476–8485.
- [97] K.-P. Huang, G.-R. Wang, B.-Y. Huang, C.-Y. Liu. *Anal. Chim. Acta* 645 (2009) 42-47.
- [98] J.F. Liu, N. Li, G.B. Jiang, J.M. Liu, J.A. Jonsson, M.J. Wen. *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 27-32.
- [99] F. Zhao, Y. Meng, J.L. Anderson. *J. Chromatogr. A* 1208 (2008) 1-9.
- [100] Y. He, J. Pohl, R. Engel, L. Rothman, M. Thomas. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4824-4830.
- [101] J.D. Li, Y.Q. Cai, Y.L. Shi, S.F. Mou, G.B. Jiang. *Talanta* 74 (2008) 498–504.
- [102] M. Baghdadi, F. Shemirani. *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 56–63.
- [103] M. Gharehbaghi, F. Shemirani, M.D. Farahani. *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 1049–1055.
- [104] Y. Meng, V. Pino, J.L. Anderson. *Anal. Chem.* 81 (2009) 7107-7112.
- [105] Q. Zhao, J.C. Wajert, J.L. Anderson. *Anal. Chem.* 82 (2010) 707-713.
- [106] X.-X. Han, D.W. Armstrong. *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 1079-1086.
- [107] G.V. Myasoedova, N.P. Molochnikova, O.B. Mokhodoeva, B.F. Myasoedov. *Anal. Sci.* 24 (2008) 1351-1353.
- [108] S. Pandey. *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 38-45.
- [109] S.A. Shamsi, N.D. Danielson. *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1729-1750.
- [110] G.A. Baker, S.N. Baker, S. Pandey, F.V. Bright. *Analyst* 130 (2005) 800-808.
- [111] F. Pacholec, H.T. Butler, C.F. Poole. *Anal. Chem.* 75 (2003) 4851-4858.
- [112] F. Pacholec, C.F. Poole. *Chromatographia* 17 (1983) 370-374.

- [113] C.F. Poole, B.R. Kersten, S.S.J. Ho, M.E. Coddens, K.J. Furton. *J. Chromatogr. A* 352 (1986) 407-425.
- [114] J. L. Anderson, D.W. Armstrong. *Anal. Chem.* 73 (2003) 4851-4858.
- [115] K. Huang, X.-X. Han, X.-T. Zhang, D.W. Armstrong. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 2265-2275.
- [116] N.K. Sharma, M.D. Tickell, J.L. Anderson, J. Kaar, V. Pino, B.F. Wicker, D.W. Armstrong, J.H. Davis, A.J. Russell. *Chem. Commun.* 6 (2006) 646-648.
- [117] L.M. Sprunger, J. Gibas, Q.Q. Baltasar, W.E. Acree, M.H. Abraham, J.L. Anderson. *Phys. Chem. Liq.* 47 (2009) 74-83.
- [118] Q.Q. Baltazar, S.K. Leininger, J.L. Anderson. *J. Chromatogr. A* 1182 (2008) 119-127.
- [119] A.W. Lantz, V. Pino, J.L. Anderson, D.W. Armstrong. *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 217-224.
- [120] J.L. Anderson, D.W. Armstrong. *Anal. Chem.* 77 (2005) 6453-6462.
- [121] J.L. Anderson, R. Ding, A. Ellern, D.W. Anderson. *J. Anal. Chem. Soc.* 127 (2005) 593-604.
- [122] M. Qi, D.W. Armstrong. *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 889-899.
- [123] A. Berthod, L. He, D.W. Armstrong. *Chromatographia* 53 (2001) 63-68.
- [124] F. Mutelet, J.N. Jaubert. *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 256-267.
- [125] F. Mutelet, V. Butet, J.N. Jaubert. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44 (2005) 4120-4127.
- [126] G. Inoue, Y. Iwai, M. Yasutake, K. Honda, Y. Arai. *Fluid Phase Equilib.* 251 (2007) 17-23.
- [127] A. Berthod, J.J. Kozak, J.L. Anderson, J. Ding, D.W. Armstrong. *Theor. Chem. Acc.* 117 (2007) 127-135.
- [128] P.H. Shetty, P.J. Youngberg, B.R. Kersten, C.F. Poole. *J. Chromatogr.* 411 (1987) 61-79.
- [129] M.M. Waichigo, N.D. Danielson. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 599-606.
- [130] M.M. Waichigo, B.M. Hunter, T.L. Riechel, N.D. Danielson. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 30 (2007) 165-184.
- [131] S.J. Liu, F. Zhou, X.H. Xiao, L. Zhao, X. Liu, S.X. Jiang. *Chin. Chem. Lett.* 15 (2004) 1060-1062.
- [132] Q. Wang, G.A. Baker, S.N. Baker, L.A. Colón. *Analyst* 131 (2006) 1000-1005.
- [133] M.M. Waichigo, T.L. Riechel, N.D. Danielson. *Chromatographia* 61 (2005) 17-23.

- [134] W. Qin, S.F.Y. Li. *Electrophoresis* 23 (2002) 4110-4116.
- [135] W. Qin, S.F.Y. Li. *Analyst* 128 (2003) 37-41.
- [136] W. Qin, H. Wei, S.F.Y. Li. *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 447-454.
- [137] W. Qin, S.F.Y. Li. *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 253-256.
- [138] J. Nawrocki. *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 29-71.
- [139] X. Yang, J. Dai, P.W. Carr. *Anal. Chem.* 75 (2003) 3153-3160.
- [140] P. Forlay-Frick, J. Fekete. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 27 (2004) 123-143.
- [141] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223-233.
- [142] L. Cárdenes, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 87-93.
- [143] A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso. *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 259-266.
- [144] B. Janoszka, U. Błaszczuk, A. Damasiewicz-Bodzek, M. Sajewicz. *Food Chem.* 113 (2009) 1188-1196.
- [145] Y. Polyakova, Y.M. Koo, K.H. Row. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11 (2006) 1-6.
- [146] M. Reta, P.W. Carr. *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 121-127.
- [147] H.A. Claessens. *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 563-583.
- [148] M.J. Ruiz-Ángel, J.R. Torres-Lapasió, S. Carda-Broch, M.C. García-Álvarez-Coque. *J. Chromatogr. Sci.* 41 (2003) 350-358.
- [149] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang. *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 39-45.
- [150] W. Zhang, L. He, G. Yanglong, X. Liu, S. Jiang. *Anal. Lett.* 827 (2003) 827-838.
- [151] X. Xiao, L. Zhao, L. Xia, S. Jiang. *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 207-211.
- [152] R. Kaliszan, M.P. Marszałł, M.J. Markuszewki, T. Bączek, J. Pernak. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263-271.
- [153] M.P. Marszałł, T. Bączek, R. Kaliszan. *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1138-1145.
- [154] M.P. Marszałł, T. Bączek, R. Kaliszan. *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 172-178.
- [155] M.P. Marszałł, R. Kaliszan. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 37 (2007) 127-140.
- [156] Y. Polyakova, Y.M. Koo, K.H. Row. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 11 (2006) 202-208.
- [157] H. Qiu, S.X. Jiang, X. Liu, L. Zhao. *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 46-50.

- [158] M.A. Stadalius, J.S. Berus, L.R. Zinder. *LC-GC* 6 (1988) 494-500.
- [159] D.V. McCalley. *LC-GC* 17 (1999) 440-456.
- [160] S.D. Rogers, J.G. Dorsey. *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 57-65.
- [161] D.V. McCalley. *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 17-28.
- [162] J.J. Kirkland. *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 9-21.
- [163] J.M. Herrero-Martínez, A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés. *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 135-145.
- [164] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, A. Berthod. *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202-208.
- [165] X. Xiaohua, Z. Liang, L. Xia, J. Shengxiang. *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 207-211.
- [166] Y. Polyakova, Y. Jin, J. Zheng, K.H. Row. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 29 (2006) 1687-1701.
- [167] Y. Polyakova, K.H. Row. *Acta Chromatogr.* 17 (2006) 210-221.
- [168] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S.X. Jiang. *Anal. Lett.* 36 (2003) 827-838.
- [169] Y. Polyakova, Y.M. Koo, K.H. Row. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 11 (2006) 1-6.
- [170] A. Paul, A. Samanta. *J. Chem. Sci.* 118 (2006) 335-340.
- [171] P.K. Mandal, A. Paul, A. Samanta. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 182 (2006) 113-120.
- [172] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran. *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 307-317.
- [173] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán. *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 267-281.
- [174] F. Toribio, R. Busquets, L. Puignou, M.T. Galcerán. *Food. Chem. Toxicol.* 45 (2007) 667-675.
- [175] T. Czajkowska, M. Jaroniec. *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 147-158.
- [176] M. Arlorio, J.D. Coisson, A. Martelli. *Chromatographia* 52 (2000) 579-583.
- [177] A. Nahum, C. Horváth. *J. Chromatogr.* 203 (1981) 53-63.
- [178] K.E. Bij, C. Horváth, W.R. Melander, A. Nahum. *J. Chromatogr.* 203 (1981) 65-84.
- [179] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran. *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 207-218.
- [180] F.U. Shah, T. Barri, J.A. Jönsson, K. Skog. *J. Chromatogr. B* 870 (2008) 203-208.
- [181] M.T. Galcerán, P. País, L. Puignou. *J. Chromatogr. A* 655 (1993) 101-110.

-
- [182] A. Martín-Calero, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 27-42.
- [183] E. Bermudo, V. Ruiz-Calero, L. Puignou, M.T. Galcerán. *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 83-90.
- [184] E. Soczewinski, C.A. Wachtmeister. *J. Chromatogr.* 7 (1962) 311-320.
- [185] J. Flieger. *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 207-216.
- [186] J.P. Foley, J.G. Dorsey. *Anal. Chem.* 57 (1983) 730-737.
- [187] “Practical high-performance liquid chromatography”, Veronika R. Meyer. Ed. John Wiley & Sons, Chichester, England, 1994.
- [188] G.A. Gross, A. Grüter. *J. Chromatogr.* 592 (1992) 271-278.
- [189] J. Hong, H.-Y. Kim, D.-G. Kim, J. Seo, K.-J. Kim. *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 27-35.
- [190] J. Seo, H.-Y. Kim, B.-C. Chung, J. Hong. *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 303-309.
- [191] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni. *Food Addit. Contam.* 24(8) (2007) 833-841.
- [192] H.L. Lord. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 2-13.
- [193] T. Dagnac, A. Padró, R. Rubio, G. Rauret. *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 19-30.
- [194] S.L.C. Ferreira, W.N.L. dos Santos, M.A. Becerra, V.A. Lemos, J.M. Bosque-Sendra. *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 443-449.
- [195] J. Gorechi, J. Pawliszyn. *Anal. Chem.* 67 (1995) 3265-3274.
- [196] W. Chang, Y. Sung, S. Huang. *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 109-122.

CAPÍTULO IV PARTE EXPERIMENTAL



IV.1. Reactivos, disoluciones y materiales

IV.2. Equipamiento

IV.3. Procedimientos

IV.4. Tratamiento de muestras

IV.1 Reactivos, disoluciones y materiales

IV.1.1 Reactivos

Las AHs utilizadas en los estudios incluidos en esta Tesis han sido: 2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol (Glu-P-2), 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ), 2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5-f]quinolina (MeIQ), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx), 3-amino-1-metil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-2), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-*b*]piridina (PhIP), 3-amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol (Trp-P-1), 2-amino-9*H*-pirido[2,3-*b*]indol (A α C), suministradas por Toronto Research Chemicals (Toronto, Canadá) y 2-amino-3-metil-9*H*-pirido[2,3-*b*]indol (MeA α C), 9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (NH), 1-metil-9*H*-pirido[3,4-*b*]indol (H) suministradas por Aldrich-Chemie (Beerse, Bélgica).

Por pesada directa de la cantidad adecuada de amina y disolución en metanol, suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania,) se prepararon disoluciones patrón que contenían 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de IQ; 420 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MeIQ y Glu-P-2; 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MeIQx; 620 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NH; 140 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de H; 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Trp-P-1; 380 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Trp-P-2 y PhIP; 230 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de A α C y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de MeA α C. A partir de estas disoluciones se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución con metanol. Las disoluciones se conservaron protegidas de la luz y refrigeradas en nevera a 0°C.

Los líquidos iónicos (LIs) utilizados en el Capítulo III de esta Tesis fueron 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (BMIm-BF₄), 1-hexil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato (HMIm-BF₄) y 1-metil-3-octilimidazolio tetrafluoroborato (MOIm-BF₄) suministrados por Fluka (Buchs, Suiza).

La trietilamina (TEA) empleada fue suministrada por Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU). El ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), el acetato amónico y el cloruro potásico empleados fueron de calidad pro-análisis y suministrados por Merck.

El acetonitrilo empleado fue suministrado por Merck. Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC y el agua fue purificada utilizando un sistema *Milli-Q gradient A10* (Millipore, UK). Todas las disoluciones se filtraron a través de filtros de membrana

Durapore® de 0.45 μm , suministrados por Millipore (Massachusetts, EEUU), antes de ser inyectadas en el sistema cromatográfico.

IV.1.2 Materiales

Las microfibras de SPME utilizadas fueron Carbowax-Templated Resin de 50 μm de espesor (CW-TPR), Poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno de 60 μm (PDMS-DVB) y Poliacrilato de 85 μm (PA) suministradas por Supelco (Bellefonte, EEUU). Estas fibras se acondicionaron usando la fase móvil hasta obtener una línea base estable.

Los cartuchos para SPE de C_{18} con 100 mg fueron suministrados por Supelco. Antes de ser utilizados, los cartuchos se acondicionaron con 5 mL de metanol, seguidos de 5 mL de agua y finalmente, 500 μL de acetato amónico.

IV.1.3 Muestras

Las muestras de extractos de carne y alimentos cárnicos infantiles fueron adquiridas en supermercados locales. Se dispuso de tres tipos de muestras de extractos de carne: granulados de caldo (de carne y de pollo), pastillas de caldo (A y B) y concentrado de caldo de carne. De la misma manera se adquirieron dos tipos de alimentos infantiles: de ternera y de pollo. En la Tabla IV.1.1 se muestran algunas propiedades nutricionales de las muestras de extractos de carne y alimentos infantiles usadas.

Tabla IV.1.1. Contenidos (g/100 g de muestra) en materia grasa, proteínas e hidratos de carbono de las muestras analizadas.

Muestra	Materia grasa	Proteínas	Hidratos de carbono
Granulado de caldo de carne	1.7	10.7	38.6
Granulado de caldo de pollo	3.7	13.1	36.6
Pastillas de caldo (A)	7	10.5	20.5
Pastillas de caldo (B)	19.1	13.7	5.3
Concentrado de caldo de carne	1.2	38.9	4.6
Alimento infantil ternera	2.6	3.6	7.5
Alimento infantil de pollo	2.8	4	7.2

IV.2 Equipamiento

Las medidas de cromatografía líquida se realizaron en un equipo de HPLC suministrado por Varian (Palo Alto, EEUU), consistente en un sistema de bombas *ProStar 230*, y acoplado a una interfaz SPME-HPLC de Supelco equipada con una cámara de desorción, para llevar a cabo la microextracción en fase sólida, o un *loop* de 20 μL , para aquellas experiencias realizadas con inyección directa, y una válvula de inyección Rheodyme.

Los sistemas de detección empleados fueron: un detector de fotodiodos en fila, *ProStar 330* de Varian, un detector de fluorescencia *Waters 474* con una resolución de ± 2 nm suministrado por Waters (Mildford, EEUU) y un detector electroquímico *ProStar 370* de Varian provisto de un electrodo de trabajo de carbono vítreo, un electrodo de referencia de Ag/AgCl, 2 M, y un electrodo auxiliar (de acero inoxidable).

Las tres columnas analíticas utilizadas en esta Tesis fueron: una columna TSK-gel-ODS-80TM (5 μm , 150 x 4.6 mm d.i.) suministrada por Tosoh Biosp (Alemania), una columna NovaPak® C18 (4 μm , 150 mm x 3.9 mm d.i.) de Waters y una columna ABZ+ plus (5 μm , 150 mm x 2.1 mm d.i.) suministrada por Supelco y una precolumna Pelliguard LC-18 (Supelco). Para el control de los equipos y la adquisición y evaluación de los datos se utilizó el software *Star 5.51 chromatography Workstation* (Varian).

Las medidas de absorción en Vis-UV y de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofotómetro 8453 de diodos en serie de Hewlett Packard (Palo Alto, EEUU) y en un espectrofluorímetro *LS 50* de Perkin Elmer (Massachusetts, EEUU), respectivamente.

Para el tratamiento de las muestras se utilizó un baño de ultrasonidos suministrado por Selecta (Barcelona, España) que permite el calentamiento simultáneo y una centrífuga de Hettich, EBA 3S (Tuttlingen, Alemania).

Las extracciones asistidas por microondas focalizadas se realizaron a presión atmosférica, a la frecuencia estándar de 2450 MHz, utilizando un *Focused MicrowaveTM Synthesis System*, modelo *Discover*, suministrado por CEM (Mattheus, EEUU) y equipado con un sistema de control de la temperatura por infrarrojos y opciones de agitación y

enfriamiento. El enfriamiento de las muestras se llevó a cabo con un flujo de aire. El control del equipo y la adquisición de datos se realizó con el *software ChemDriverTM* (CEM).

La elución de los cartuchos C₁₈ de SPE se llevó a cabo utilizando un sistema de vacío *VisiprepTM* suministrado por Supelco.

Para el tratamiento estadístico de los datos y los diseños experimentales se hizo uso del *software Statgraphics Plus* para Windows V 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, EEUU).

IV.3 Procedimientos

IV.3.1 Separación cromatográfica de las AHs

HPLC con detección Vis-UV y Fluorescente

Para la separación y determinación de las AHs se utilizó una fase móvil ternaria de TEA 10 mM/fosfórico a pH 3.2 (Disolvente A), acetonitrilo (Disolvente B) y TEA 10mM/fosfórico a pH 3.6 (Disolvente C), con el programa de gradiente indicado en la Tabla IV.3.1 y con un flujo de 1 mL min⁻¹.

Tabla IV.3.1. Programa de gradiente utilizado para la separación de AHs

Composición fase móvil (%)	Intervalo de tiempo (min)
5 – 12% de B en A	0 – 8.40
12 – 25% de B en C	8.41 – 20
25 – 50% de B en C	20.01 – 31.30
50% de B en A	31.31
50 – 5% de B en A	31.32 – 36.30
5% de B en A	36.31 – 41.30

Se emplearon dos tipos de detectores: Vis-UV y fluorescencia, con los programas de longitudes de onda que se muestran en las Tablas IV.3.2 y IV.3.3.

Tabla IV.3.2. Programa de longitudes de onda del detector Vis-UV utilizado para la determinación de AHs.

Intervalo de tiempo (min)	Longitud de onda (nm)
0 – 9.70	254
9.70 – 11.50	267
11.50 – 16.30	263
16.30 – 20	248
20 – 25	263
25 – 28.50	339
28.50 – 31	343

Tabla IV.3.3 Programa de longitudes de onda del detector de fluorescencia utilizado para la determinación de AHs

Tiempo (min)	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Compuesto
0.0	298	442	
14	298	442	NH H
19	264	410	Trp-P-2 PhIP Trp-P-1
25	343	386	A α C MeA α C

HPLC con detección Electroquímica

La separación cromatográfica de las AHs se llevó a cabo mediante una fase móvil ternaria, a un flujo de 1 mL min⁻¹: acetato amónico 50 mM-ácido acético a pH 4 : acetonitrilo (9:1) (Disolvente A), acetato amónico 50 mM-ácido acético a pH 6 : acetonitrilo (7:3) (Disolvente B) y acetato amónico 50 mM-ácido acético a pH 6 : acetonitrilo (6:4) (Disolvente

C), conteniendo en todos los casos 2 mM KCl y 0.1 mM EDTA. El programa de gradiente se muestra en la Tabla IV.3.4. Las columnas y el detector fueron termostatzados a 30°C.

Los potenciales de trabajo del detector electroquímico se fijaron a +1000 mV para la fracción polar (de 0 a 34.3 min) y +950 mV para la fracción menos polar (de 34.3 a 63 min), como puede verse en la Tabla IV.3.4.

Tabla IV.3.4. Programa de gradiente y potencial aplicado para la separación de las AHs mediante HPLC con detección electroquímica.

E (mV)	Tiempo (min)	Composición de la fase móvil			Compuesto
		% A	% B	% C	
+1000	0	100			Glu-P-2 IQ MeIQ
	27	100			MeIQx
+950	30		100		NH H Trp-P-2 Trp-P-1
	44		100		
	45			100	PhIP A α C MeA α C
	63			100	

IV.3.2 Empleo de líquidos iónicos (LIs) como aditivos a la fase móvil para la determinación de las AHs mediante HPLC. Condiciones cromatográficas

HPLC con detección Vis-UV y fluorescente

Las fases móviles se prepararon disolviendo cantidades conocidas de líquidos iónicos o TEA en agua Milli Q, hasta alcanzar concentraciones de 1, 2, 4, 6, 10 y 12 mM para los LIs y 10 mM para la TEA. El valor de pH de las fases móviles que contenían LIs fue ajustado a

3.6 utilizando HCl 10% (v/v) o NaOH 0.01 M. Para las fases móviles que contenían TEA, el valor de pH también fue ajustado a 3.6, utilizando en este caso ácido fosfórico 10% (v/v). La elución de las aminas se llevó a cabo en modo isocrático con un 18% (v/v) de acetonitrilo en las fases móviles y a una velocidad de flujo de 1.0 mL min⁻¹ en todas las experiencias.

La detección fluorescente se llevó a cabo ajustando la longitud de onda en 264 y 410 nm, para la excitación y emisión respectivamente. El detector Vis-UV se fijó a una longitud de onda de 263 nm.

HPLC con detección fluorescente en modo gradiente

La separación cromatográfica de las AHs se llevó a cabo con una fase móvil binaria a una velocidad de flujo de 1.0 mL min⁻¹, BMIm-BF₄ 1 mM a pH 3.6 (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B). El programa de gradiente fue: 19% de B en A desde 0 a 13 minutos; luego se pasa del 19 al 30% de B en A, desde los 13.01 a los 16 minutos; se mantiene al 30% de B en A, desde los 16.01 a los 22 minutos; volviendo a las condiciones iniciales en 5 minutos y manteniendo esas condiciones durante 5 minutos más para estabilizar el sistema.

La detección fluorescente se llevó a cabo utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 264 y 410 nm, respectivamente.

HPLC con detección electroquímica

El potencial de trabajo para el detector electroquímico se fijó a +1000 mV. La separación cromatográfica de las AHs se llevó a cabo bajo condiciones isocráticas a una velocidad de flujo de 1.0 mL min⁻¹. Las fases móviles se prepararon con agua MilliQ y acetonitrilo, conteniendo en todos los casos 2 mM de KCl y 0.1 mM de EDTA.

Las fases móviles con aditivos son aquellas que contienen LIs (1, 2, 4, 6, 10 y 12 mM) o acetato amónico (50 mM). Las fases móviles preparadas con los LIs se ajustaron a pH 3.6, utilizando HCl 10% (v/v) o NaOH 0.01 M. Las fases móviles preparadas con acetato amónico se ajustaron a pH 6 utilizando ácido acético.

IV.3.3 SPME-HPLC para la determinación de AHs

SPME-HPLC con detección Vis-UV

La SPME se lleva a cabo, en viales de 4 mL provistos de tapa con *septum*, con alícuotas de 4 mL de las disoluciones estándar que contenían un 0.9% de metanol. La fibra se sumerge directamente en la disolución durante 15 minutos o el tiempo de absorción adecuado según cada experiencia, en todos los casos a temperatura ambiente. Las disoluciones se agitan con un agitador magnético a 800 rpm durante todo el proceso de extracción.

Tras la extracción, la fibra de SPME se introduce en la cámara de desorción de la interfaz SPME-HPLC que está *off-line*, a presión atmosférica, es decir, con la válvula de inyección en la posición *load*. La cámara de 60 μ L se llena previamente con fase móvil inicial (A-B, 95:5, ver Tabla IV.3.1) o con el disolvente de desorción empleado en cada experiencia, y la fibra se sumerge durante 15 minutos o el tiempo de inmersión adecuado según cada experiencia. En este momento la válvula se coloca en la posición *inject* y los analitos pasan a la columna para su separación. Se hace retornar la válvula a la posición *load*, después de 1 minuto o el tiempo de desorción adecuado según cada experiencia, y entonces se lava la cámara con 6 porciones de 250 μ L de fase móvil, B-C, 50:50, para minimizar la posibilidad de efecto memoria de los analitos. A continuación, se extrae la fibra de SPME.

SPME-HPLC con detección fluorescente

Se tomaron alícuotas de 4 mL de las disoluciones estándar que contenían un 2.5% de metanol y 0.05 M en NaOH, en viales de 4 ml cerrados y provistos de tapa con *septum*. La fibra se sumerge directamente en la disolución durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las disoluciones se agitan con un agitador magnético (800 rpm) durante todo el proceso de la extracción de las AHs.

Después de la extracción, el procedimiento a seguir para la fase de desorción es el mismo que el descrito en el apartado anterior, manteniéndose la fibra sumergida en la cámara de desorción un tiempo de 9 minutos. La cámara (60 μ L) se llena previamente con metanol o con el disolvente de desorción empleado en cada experiencia.

El lavado posterior de la fibra, para evitar el efecto memoria, se realiza con cuatro porciones de 250 μL de fase móvil, B-C, 50:50 (ver Tabla IV.3.1).

SPME-HPLC con detección electroquímica

La SPME se llevó a cabo de la misma manera que se ha descrito en el apartado anterior, empleando en este caso un tiempo de absorción de 15 minutos.

Después se procede al paso de desorción, tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, manteniéndose la fibra sumergida en la cámara de desorción durante 15 minutos. La cámara se llena previamente con la fase móvil inicial (50 mM acetato amónico a pH 4 : acetonitrilo (9:1) (ver Tabla IV.3.4) o con el disolvente de desorción empleado en cada experiencia.

Para eliminar el efecto memoria, la cámara y la fibra se lavan con seis porciones de 250 μL de Disolvente C (ver Tabla IV.3.4).

IV.3.4 SPME-HPLC con detección fluorescente, empleando LIs como aditivos a la fase móvil y como disolventes de desorción

La SPME se llevó a cabo de la misma manera descrita en el apartado anterior, empleando en este caso un tiempo de absorción de 30 minutos.

Después se procede al paso de desorción, tal y como se ha descrito en los apartados anteriores, manteniéndose la fibra sumergida en la cámara de desorción durante 4 minutos o el tiempo de inmersión adecuado según cada experiencia, con una mezcla BMIm-BF₄ 25 mM-metanol (4:6) o con el disolvente de desorción adecuado en cada experiencia.

Para estudiar el efecto memoria, después de llevar a cabo una absorción y una desorción en las mismas condiciones indicadas anteriormente, sin lavar la cámara ni la fibra, ésta se sumerge nuevamente durante 4 minutos en la cámara de desorción llena con la mezcla BMIm-BF₄ 25 mM-metanol (4:6). Entonces, la válvula se pone en la posición *inject* durante 1 minuto y cuando la válvula se coloca de nuevo en la posición *load*, la cámara y la fibra fueron lavadas con una porción de 250 μL de metanol o BMIm-BF₄ 25 mM-metanol (4:6), dependiendo del experimento. Este paso se repite con sucesivas desorciones de la fibra en la

cámara, llena con la mezcla BMIm-BF₄-metanol (4:6) y lavados con porciones de 250 µL de metanol o BMIm-BF₄ 25 mM-metanol (4:6), hasta que no se observó efecto memoria (área de pico < 0.1% del área de pico inicial).

IV.4 Tratamiento de Muestras

IV.4.1 Enriquecimiento de las muestras

El proceso de enriquecido de las muestras consiste en añadirles lentamente una disolución que contiene las AHs en metanol, la muestra se agita durante unos minutos y se guarda en la oscuridad durante 24 horas. Los niveles a los cuales se añadieron las AHs se indican en cada uno de los Capítulos de esta Tesis.

IV.4.2 Extracción asistida por ultrasonidos

Se enriquecieron porciones de 1 gramo de muestra tal y como se ha comentado en el apartado anterior. Una vez evaporado el metanol, se añadieron 3 mL de fase extractante, consistente en una disolución 2.5% metanol y 0.05 M NaOH o con la composición adecuada para cada experiencia. La disolución resultante se somete a ultrasonidos durante 4.5 minutos a media potencia y a 41-44°C. Posteriormente se centrifuga durante 20 minutos a 4000 rpm. Se separa el sobrenadante, que se coloca en un embudo de decantación de 100 mL, y se realiza una segunda extracción con otros 3 mL de fase extractante. Una vez reunidos los dos volúmenes de fase extractante (6 mL), se coloca el embudo en el congelador durante una hora, con objeto de separar la grasa que contiene la muestra. Se decantan 5 mL aproximadamente (la grasa queda en la parte superior del embudo) y se someten a centrifugación. Se toma una alícuota de 4 mL que se coloca en un vial para realizar la microextracción en fase sólida bajo las condiciones anteriormente descritas (apartado IV.3.3).

IV.4.3 Extracción asistida por microondas focalizadas

Tratamiento de muestras mediante microondas focalizadas

A una porción de 1 gramo de muestra de extracto de carne (enriquecido o no según la experiencia a realizar), colocada en un tubo Pirex® de 40 mL, se le añadieron 6 mL de fase

extractante (2.5% de metanol en 0.05M NaOH), colocándose en su interior un agitador magnético. El tubo de extracción se coloca en el interior del microondas. La extracción óptima se llevó a cabo bajo una radiación máxima de 20 W (potencia del horno microondas). Las muestras se expusieron a las microondas hasta que la temperatura alcanzó los 80°C, y se mantuvieron a esta temperatura durante 1 minuto. La muestra se mantiene agitada durante todo el proceso de extracción por microondas. Posteriormente, se deja enfriar el tubo hasta temperatura ambiente. El sobrenadante se separa y se coloca en un embudo de decantación de 100 mL. El embudo se coloca en el congelador durante 1 hora a -18°C. Este paso de purificación se requiere para eliminar las grasas y lípidos de las muestras. Se decantan aproximadamente 3 mL, que se someten a centrifugación. Se diluye una alícuota de 2 mL (ya centrifugada) hasta 5 mL con agua MilliQ y se analiza mediante HPLC según el procedimiento optimizado bien por HPLC con detección electroquímica (apartado IV.3.2), SPME-HPLC con detección fluorescente (apartado IV.3.3) (en este caso se decantan 5 mL de los extractos a los que se les ha eliminado la grasa, se centrifuga, y se toma una alícuota de 4 mL para llevar a cabo la SPME) o SPME-HPLC con detección fluorescente empleando LIs como aditivos a la fase móvil y disolventes de desorción (apartado IV.3.4) (diluyéndose una alícuota de 0.5 mL del extracto a 5 mL con agua MilliQ).

Tratamiento de muestras mediante microondas focalizado para el análisis de AHs en alimentos cárnicos infantiles mediante SPE-HPLC con detección electroquímica

El proceso de extracción de las muestras mediante microondas focalizadas se realizó de la misma manera que en el apartado anterior empleando en este caso una fase extractante compuesta por 20% (v/v) de metanol y 0.8 M de NaOH o con las concentraciones adecuadas a las diferentes experiencias a realizar. El extracto obtenido se centrifuga durante 20 minutos a 4000 rpm. Se toma una alícuota de 4 mL del sobrenadante y diluye hasta 20 mL con acetato amónico 50 mM y se somete al paso de purificación por SPE con un cartucho de C₁₈.

La fase diluida con acetato amónico se introduce en el cartucho C₁₈ de 100 mg acondicionado tal y como se indica en el apartado IV.1.2. Este cartucho se lava con 5 mL de agua Milli-Q, y se eluye con 1 mL de la mezcla BMIm-BF₄ 10 mM : acetonitrilo (1:1) o con el disolvente adecuado a cada una de las experiencias realizadas. 20 µL de esta disolución se inyectan directamente en el sistema HPLC para las separación y cuantificación de las AHs.

CONCLUSIONES



- C.1. Acoplamiento SPME-HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica

- C.2. Líquidos iónicos como aditivos a la fase móvil

C.1 Acoplamiento SPME-HPLC con detección Vis-UV, fluorescente y electroquímica

C.1.1 Acoplamiento SPME-HPLC con detección Vis-UV

- Se propone la Microextracción en Fase Sólida acoplada a HPLC con detección Vis-UV con diodos en serie para la determinación de 10 Aminas Heterocíclicas. Se ha establecido que la fibra con recubrimiento de CW-TPR, entre las ensayadas, es la más adecuada para la determinación de las AHs, y que la desorción en modo estático proporciona mejores resultados que el modo dinámico.
- El uso de un diseño factorial completo de dos niveles, como primera aproximación, seguido de un diseño Doehlert de superficies de respuesta, ha permitido optimizar las variables experimentales que afectan tanto al proceso de extracción como al proceso de desorción. Las condiciones óptimas encontradas han sido: 15 minutos para el tiempo de absorción, 15 minutos para el tiempo de inmersión y 1 minuto para el tiempo de desorción.
- Se ha establecido un método para la determinación de AHs, mediante la SPME-HPLC con detección Vis-UV. Los límites de detección obtenidos se encuentran en el intervalo 1.58 a 23.8 ng·mL⁻¹, para Trp-P-2 y PhIP, respectivamente. En general, las aminas menos polares presentan límites de detección más bajos que las aminas polares. La precisión del método, expresada como desviación estándar relativa, muestra valores comprendidos entre 2.2 y 28%.
- Se ha llevado a cabo un estudio de recuperaciones en muestras de extractos de carne enriquecidos. Las recuperaciones obtenidas oscilaban entre 41.7% para Trp-P-1 y 115.4% para MeIQx.

C.1.2 *Acoplamiento SPME-HPLC con detección fluorescente*

- En atención a las bajas concentraciones en que suelen encontrarse las AHs en los alimentos, se ha desarrollado una nueva metodología SPME-HPLC, que proporciona mayor sensibilidad, basada en la sustitución del detector Vis-UV de diodos en serie por otro de fluorescencia. En este caso, las aminas estudiadas se limitaron a las aminas menos polares, puesto que las polares no presentan fluorescencia en las condiciones experimentales utilizadas.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en el proceso de optimización del método SPME-HPLC-Vis-UV y a las aminas incluidas en este estudio, se eligieron 30 minutos como tiempo de absorción, 9 minutos como tiempo de inmersión y 1 minuto como tiempo de desorción. Por otra parte, atendiendo a la naturaleza no polar de la mayoría de las aminas incluidas en este estudio, se escogió el metanol como disolvente de desorción, observándose incrementos en la eficiencia de desorción superiores al 100%, en relación con los obtenidos usando como disolvente de desorción la fase móvil inicial.
- La utilización de las condiciones de absorción y desorción optimizadas y de las longitudes de onda de excitación y emisión máximas para cada amina, ha permitido establecer un método para la determinación de AHs mediante la SPME-HPLC con detección fluorescente que presenta límites de detección comprendidos entre 0.047 ng mL⁻¹ para MeAαC y 0.190 ng mL⁻¹ para PhIP. Estos límites de detección son entre 40 y 100 veces menores que los obtenidos con el método SPME-HPLC-Vis-UV.
- Se han establecido las condiciones apropiadas para la extracción asistida por ultrasonidos de AHs contenidas en extractos de carne, como paso previo a su determinación por SPME-HPLC. Mediante el empleo de diseños factoriales, se han fijado los valores óptimos de las variables que afectan al proceso de extracción: composición de la fase extractante (porcentaje de metanol y concentración de NaOH) y tiempo de extracción. Por otra parte, una vez realizada la etapa de extracción asistida por ultrasonidos, las muestras se someten a un paso criogénico consistente en su congelación durante 1 hora, para eliminar las grasas contenidas en los extractos de carne.

- Se evaluó la aplicabilidad del método SPME-HPLC con detección fluorescente llevando a cabo estudios de recuperación en tres tipos diferentes de extractos de carne a dos niveles de concentración incluidos dentro del intervalo de linealidad del método, así como la determinación de las aminos en muestras sin enriquecer. En general, las mejores recuperaciones se obtienen para concentraciones de aminos comprendidas entre 16 y 159 ng g⁻¹, siendo superiores al 60% para todas las aminos en las distintas muestras, con la excepción de la MeAαC. El método SPME-HPLC con detección fluorescente para la determinación de AHs, permite simplificar las etapas de limpieza y eliminar diferentes pasos de extracción en fase sólida, requeridos en el análisis de estos compuestos en extractos de carne, con el consiguiente ahorro de tiempo de análisis y de disolventes orgánicos.
- Se propone la extracción asistida por microondas focalizadas para la determinación de AHs presentes en extractos de carne como paso previo a su determinación por SPME-HPLC con detección fluorescente, usando las siguientes condiciones experimentales: 20 W de potencia de microondas, 80°C de temperatura máxima, manteniéndose esta temperatura durante 1 minuto. Una vez realizada la etapa de extracción, las muestras se someten a una etapa criogénica para eliminar la grasa contenida en las muestras. El método propuesto permite detectar y cuantificar 8 de las AHs menos polares en muestras de extracto de carne de distinta naturaleza. NH y H son las aminos que se encontraron en mayor cantidad en todas las muestras analizadas, oscilando entre 10.1 y 170.2 ng g⁻¹ para NH y 2.53 y 34.3 ng g⁻¹ para H. El método propuesto simplifica considerablemente, comparado con otras metodologías, el tratamiento de las muestras que contienen un alto contenido de grasas y bajos contenidos de AHs.

C.1.3 Acoplamiento SPME-HPLC con detección electroquímica versus inyección directa

- Se ha establecido un método para la determinación de 11 AHs por HPLC con detección electroquímica. En general, las AHs presentan un buen comportamiento electroquímico debido a la presencia de su grupo amino, sin embargo en todas las aplicaciones descritas en la bibliografía, las aminos deben separarse en dos grupos atendiendo a su polaridad, llevándose a cabo su determinación con el uso de dos condiciones cromatográficas diferentes. El método desarrollado, permite la elución de las aminos polares y no polares en un solo cromatograma, empleando un gradiente de elución, nada frecuente cuando se emplea la detección electroquímica. Todas las aminos muestran una buena linealidad y límites de detección ligeramente mejores que los obtenidos por otros autores, comprendidos entre 0.16 y 2.68 ng inyectados para Trp-P-1 y NH, respectivamente.
- Las condiciones experimentales óptimas para llevar a cabo la SPME acoplada a HPLC con detección electroquímica para la determinación de AHs fueron: 15 minutos para el tiempo de absorción, 15 minutos para el tiempo de inmersión, 1 minuto para el tiempo de desorción, usando como disolvente de desorción la fase móvil inicial, ya que, además de las ventajas prácticas, se favorece la desorción de las aminos polares, que muestran una mayor afinidad por la fase polimérica. Sin embargo, en el estudio de los parámetros de calidad del método se observó una marcada falta de linealidad en las curvas analíticas y pobre repetitividad en las áreas de pico para la mayoría de las aminos. Este comportamiento podría ser debido a una saturación de los puntos activos de la fibra y una competencia entre los analitos por ocupar dichos puntos.
- Se desarrolla un método para la extracción asistida por microondas focalizadas de AHs contenidas en extractos de carne como paso previo a su determinación por HPLC con detección electroquímica e inyección directa. Mediante el empleo de diseños factoriales, se han determinado los valores óptimos de las siguientes variables experimentales: potencia del microondas (20 W), temperatura máxima a alcanzar (80°C) y tiempo en el cual la temperatura máxima se mantiene constante (1 min). En estas condiciones, el tiempo total de extracción por microondas es de aproximadamente 5 minutos, destacando los cortos tiempos de extracción que son

necesarios con el método propuesto. Una vez realizada la etapa de extracción asistida por microondas focalizado, las muestras se someten a un paso criogénico para eliminar la grasa contenida en los extractos de carne. La evaluación de las eficiencias de extracción, usando cinco clases diferentes de extractos de carne, pone de manifiesto la gran dependencia entre el proceso de extracción y la naturaleza de la matriz de las muestras, especialmente para las aminos menos polares. Las recuperaciones oscilan entre 36% para PhIP en pastillas de caldo y 109% para Tr-P-1 en el concentrado de caldo de carne.

C.2 Líquidos iónicos como aditivos a la fase móvil

C.2.1 *Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de AHs mediante HPLC con detección Vis-UV y fluorescente*

- Se determinan las características espectrofluorimétricas de las AHs en presencia de los LIs. Con objeto de cuantificar el efecto que se produce en la intensidad de fluorescencia emitida por las AHs en presencia de los LIs, se definen los Factores de Sensibilización, relación entre la intensidad relativa de fluorescencia en presencia de los LIs y la obtenida en ausencia de aditivo. En general, el BMIm-BF₄ da lugar a los factores de sensibilización más altos. Este incremento en la fluorescencia emitida debe conducir a métodos cromatográficos más sensibles y a menores límites de detección.
- Se estudia el efecto enmascarante de los grupo silanol residuales por los LIs BMIm-BF₄, HMIm-BF₄ y MOIm-BF₄ para tres fases estacionarias que presentan actividad de los grupos silanol moderada (NovaPak® y TSK-Gel ODS-80TM) o baja (ABZ+plus). Para cuantificar la capacidad de los LIs para bloquear los silanoles libres se determinaron las constantes de enlace silanol-LI. Los valores de dichas constantes, para las fases estacionarias con actividad de los grupos silanol moderada, aumentan a medida que aumenta el número de átomos de carbono en la cadena alquílica del LI, obteniéndose, en general, los valores más altos para el LI MOIm-BF₄. Por otra parte, los valores de las constantes de enlace silanol-LI determinadas, permitieron establecer

las concentraciones de LI recomendadas para reducir los efectos de los grupos silanol residuales en un porcentaje prefijado.

- Se han estudiado los beneficiosos efectos de tres LIs de la familia del alquilimidazolio (BMIm-BF₄, HMIm-BF₄ y MOIm-BF₄) como aditivos a la fase móvil con detección Vis-UV y fluorescente para la determinación de un grupo de AHs, empleando tres fases estacionarias con diferente actividad de los grupos silanol. Los resultados se compararon con los obtenidos cuando se emplea la trietilamina (TEA), aditivo comúnmente empleado como supresor de los grupos silanol residuales en la determinación por HPLC de compuestos básicos, pudiendo establecerse que: (1) La conjunción de la disminución de los tiempos de retención y las mejoras en las colas de los picos hacen que los cromatogramas obtenidos con los LIs presenten picos más estrechos y mejor definidos que cuando empleamos TEA como aditivo. Estas mejoras se producen en las fases estacionarias que presentan una actividad moderada de los grupos silanol residuales, contribuyendo a obtener mejores resoluciones cromatográficas. (2) BMIm-BF₄ 1 mM como aditivo a la fase móvil resultó ser la mejor condición con respecto a los tiempos de retención y formas de los picos.
- Se establecen las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de AHs usando LIs como aditivos a la fase móvil con detección Vis-UV y fluorescente: 1 mM BMIm-BF₄ y la columna NovaPak®. Bajo estas condiciones y con un pH = 3.6 y 18% (v/v) de acetonitrilo en la fase móvil, se obtienen límites de detección para las distintas AHs comprendidos entre 0.001 y 0.147 µg mL⁻¹ con detección Vis-UV, y entre 0.001 y 0.006 ng mL⁻¹ con detección fluorescente, mientras que las desviaciones estándar relativas son, en general, inferiores al 6.6%. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el uso de BMIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil en HPLC en conjunción con una técnica de detección sensible como es la fluorescencia permite alcanzar los niveles de ng g⁻¹, necesarios para la determinación de AHs en muestras de alimentos sin requerir etapas de preconcentración.

C.2.2 *Líquidos Iónicos como aditivos a la fase móvil para la determinación de AHs mediante HPLC con detección Electroquímica*

- Se ha estudiado la influencia, en la respuesta del detector electroquímico, de los cambios en las características iónicas de la fase móvil debido a la presencia de LIs. Con tal finalidad, se han realizado curvas intensidad-potencial de fases móviles conteniendo un 18% de acetonitrilo y 1 mM de cada uno de los LIs BMIm-BF₄, HMIm-BF₄ y MOIm-BF₄. Observándose que para potenciales aplicados de +1000 mV, potencial usual en la detección electroquímica de las AHs, las fases móviles que contienen LIs muestran corrientes de fondo unas tres veces inferiores a las obtenidas con fases móviles conteniendo acetato amónico 50 mM, normalmente empleada para las determinaciones de AHs mediante HPLC con detección electroquímica. Esta disminución en la corriente de fondo conduce a cromatogramas con línea base más estables, menor ruido y por tanto mejores límites de detección.
- Se han puesto de manifiesto los beneficiosos efectos de tres LIs de la familia del alquilimidazolio (BMIm-BF₄, HMIm-BF₄ y MOIm-BF₄), como aditivos a la fase móvil, en los parámetros cromatográficos de un grupo de AHs, empleando tres fases estacionarias que presentan actividad de los grupos silanol moderada (NovaPak® y TSK-Gel ODS-80TM) o baja (ABZ+plus) y usando detección electroquímica. Los resultados se compararon con los obtenidos cuando se emplea la acetato amónico 50 mM, aditivo comúnmente empleado en HPLC de AHs.
- Se establecen las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de AHs usando LIs como aditivos a la fase móvil con detección electroquímica: 1 mM BMIm-BF₄ y la columna NovaPak®. Bajo estas condiciones y con un pH 3.6 y 19% (v/v) de acetonitrilo en la fase móvil, se obtienen límites de detección comprendidos entre 0.002 y 0.124 ng inyectados para MeAaC y H, respectivamente, mientras que las desviaciones estándar relativas son inferiores al 7%. Como tendencia general, la presencia del LI BMIm-BF₄ en la fase móvil conduce a una mejor linealidad de las curvas de regresión y menores límites de detección que los obtenidos cuando se emplea acetato amónico como aditivo.

- Se desarrolla un método que combina la extracción en fase sólida con una etapa previa de extracción asistida por microondas y un paso criogénico para la determinación de AHs en muestras de alimentos cárnicos infantiles. Las AHs son analizadas por HPLC con detección electroquímica usando LIs como aditivos a la fase móvil. El método desarrollado ha permitido comprobar la validez de los LIs como disolventes de elución en SPE. Usando como mezcla de elución 10 mM BMIm-BF₄ : acetonitrilo (1:1), las recuperaciones obtenidas oscilan entre 85,7% para Trp-P-2 y 105,6% para MeAαC. El método de extracción y preconcentración propuesto se aplicó a la determinación de seis AHs en dos clases de alimentos infantiles cárnicos: de ternera y de pollo. En general, se obtienen mayores recuperaciones para los alimentos infantiles de ternera y son comparables con las que se obtienen con matrices similares, requiriendo menos etapas de limpieza y preconcentración.

C.2.3 Líquidos Iónicos como disolventes de desorción, supresores del efecto memoria y aditivos a la fase móvil en el acoplamiento SPME-HPLC con detección fluorescente para la determinación de seis AHs

- Atendiendo a las propiedades solubilizantes de los LIs, se ha desarrollado una nueva aplicación de los LIs, su utilización como disolvente de desorción en SPME-HPLC-detección fluorescente y como supresor del efecto memoria asociado a este acoplamiento. Mediante el empleo de diseños factoriales, se han optimizado las variables que afectan al proceso de desorción en la determinación de NH, H, Trp-P-2, Trp-P-1, AαC y MeAαC mediante SPME-HPLC con detección fluorescente. Los resultados mostraron que una mezcla BMIm-BF₄ y metanol era la óptima como disolvente de desorción y, además, se requería de un tiempo de inmersión menor que cuando se empleaba metanol. Asimismo, la mezcla compuesta por BMIm-BF₄ 25 mM y metanol (4:6) resultó ser un supresor del efecto memoria tan adecuado como el metanol.
- Se ha establecido un método para la determinación de AHs mediante SPME-HPLC –detección fluorescente usando BMIm-BF₄ como aditivo a la fase móvil, como disolvente de desorción y como supresor del efecto memoria. La precisión del método expresada como desviación estándar relativa es inferior al 11.1% y los límites de detección obtenidos se encuentran entre 0.3 y 75 ng L⁻¹. En la mayoría de los casos,

estos límites de detección fueron al menos diez veces inferiores que los obtenidos cuando se emplea la trietilamina como aditivo a la fase móvil. Esta disminución en los límites de detección puede atribuirse a la conjunción del uso de los LIs como aditivos a la fase móvil y como disolvente de desorción, permitiendo conjugar las ventajas cromatográficas con las mayores eficiencias de desorción que pueden presentar los LIs. Se llevó a cabo la aplicabilidad del método propuesto, realizando estudios de recuperación en muestras de extractos de carne comerciales (granulado de caldo de carne) obteniéndose valores medios comprendidos entre 118% y 68.5%. Asimismo, el método ha permitido la determinación con éxito del contenido de AHs en extractos de carne comerciales.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



A	Semianchura frontal de pico
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AHs	Aminas Heterocíclicas
AIAs	Aminoimidazoazarenos
AcOH	Ácido Acético
AcONH ₄	Acetato amónico
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>)
API	Ionización a Presión Atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Ionization</i>).
B	Semianchura de cola de pico
C ₁₈	Octadecilo
CCC	Cromatografía en contra -corriente (<i>Counter-Current Chromatography</i>)
CE	Electroforesis Capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CIAME	Microextracción mediante agregados inducidos por congelación (<i>Cold induced aggregates microextraction</i>)
C _{LI}	Concentración recomendada de líquido iónico para reducir los efectos de los grupos silanol residuales en un determinado valor.
CZE	Electroforesis Capilar de Zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
d.	Detectado
DAD	Detección con Diodos en Serie (<i>Diode Array Detection</i>)
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Potencial
EI	Ionización Electrónica (<i>Electron Ionization</i>)

EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ESI	Ionización por Electropulverización (<i>Electrospray Ionization</i>)
Fc	Factor de cola
FS	Factor de sensibilización
GC	Cromatografía de Gases (<i>Gas Chromatography</i>)
HAPs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>)
HPTLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Capa Fina (<i>High Pressure Thin Layer Liquid Chromatography</i>)
HREI	Ionización Electrónica de Alta Resolución (<i>High Resolution Electrón Ionization</i>)
HS-SPME	Microextracción en Fase Sólida de Espacio de Cabeza (<i>Headspace-Solid Phase Microextraction</i>)
IF	Intensidad de Fluorescencia
ISAAC	Electrodo Ag/AgCl <i>in situ</i> (<i>In situ Ag/AgCl</i>)
IT	Trampa de Iones (<i>Ion Trap</i>)
k	Factor de retención
k ₀	Factor de retención en ausencia de aditivo a la fase móvil
k ₂	Factor de retención silanofílico
k _w	Factor de retención de un analito en fase móvil libre de modificador orgánico
K _A	Constante del enlace entre los grupos silanol y el agente supresor
LC	Cromatografía Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Límite de detección
LIs	Líquidos Iónicos
LLE	Extracción Líquido-Líquido (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
LPME	Microextracción en Fase Líquida (<i>Liquid Phase Microextraction</i>)

LREC	Captura Electrónica de Baja Resolución (<i>Low Resolution Electron Capture</i>)
MECK	Cromatografía Electrocinética Capilar Micelar (<i>Micelar Electrokinetic Capillary Chromatography</i>)
MeOH	Metanol
MRM	Registro de Múltiples Reacciones (<i>Multiple Reaction Monitoring</i>)
MS	Espectrometría de Masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tándem
N	Número de platos teóricos
N ₀	Número de platos teóricos en ausencia de aditivo
n.c.	No cuantificado
n.d.	No detectado
NICI	Ionización Química en Modo Negativo (<i>Negative Ion Chemical Ionization</i>)
NPD	Detección Selectiva de Nitrógeno y Fósforo (<i>Nitrogen-Phosphorous Detection</i>)
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno
PILs	Líquidos Iónicos Poliméricos (<i>Polymeric Ionic Liquids</i>)
PRS	Propilsulfonato
MAB	Bombardeo con Átomos Metaestables (<i>Metastable atom bombardment</i>)
R	Coefficiente de Correlación
Ref.	Referencia
RPLC	Cromatografía Líquida en Fase Inversa (<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i>)
R _s	Resolución
RSD	Desviación Estándar Relativa (<i>Relative Standard Deviation</i>)
RTILs	Líquidos Iónicos a Temperatura Ambiente (<i>Room Temperatura Ionic Liquids</i>)

S	Fuerza de elución
SCX	Intercambiador Catiónico Fuerte (<i>Strong Cation Exchange</i>)
SD	Desviación estándar (<i>Standard Deviation</i>)
SFE	Extracción con Fluidos Supercríticos (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SIM	Registro de un Único Ion (<i>Single Ion Monitoring</i>)
SPE	Extracción en Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextracción en Fase Sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SR	Superficie de Respuesta
SRM	Registro de una Reacción Seleccionada (<i>Selected Reaction Monitoring</i>)
$S_{y/x}$	Desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado
t_a	Tiempo en el frente del pico cromatográfico para una altura del 5%
t_{abs}	Tiempo de absorción
t_b	Tiempo en la cola del pico cromatográfico para una altura del 5%
t_{des}	Tiempo de desorción
t_{ext}	Tiempo de extracción
t_{imm}	Tiempo de inmersión
TEA	Trietilamina
TLC	Cromatografía en Capa Fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
ToF	Tiempo de Vuelo (<i>Time of Flight</i>)
t_R	Tiempo de Retención
TSP	Electropulverización Térmica (<i>Thermospray</i>)
UV	Ultravioleta
W	Wattios
w	Ancho de pico (<i>Wide</i>)
φ	Fracción de volumen de modificador orgánico en la fase móvil

ANEXO



A.1. Comunicaciones a Congresos

A.2. Artículos publicados

A.1. Comunicaciones a Congresos

1. A. Martín-Calero, L. Cárdenes, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Solid-phase microextraction coupled to HPLC for the determination of heterocyclic aromatic amines*”. Euroanalysis XIII, Salamanca, Septiembre 2004.
2. A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Fast extraction of heterocyclic amines in foods*”. 11^{as} Jornadas de Análisis Instrumental (JAI 2005), Barcelona, Noviembre 2005.
3. A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Rapid sample pre-treatment assisted by focussed microwave radiation and SPME prior to HPLC-Fluorescence quantification of less polar Heterocyclic Amines in meat extracts*”. XIII International Symposium on Luminiscence Spectrometry (ISLS 2006), Lugo, Julio 2006.
4. A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Solid phase microextraction coupled to HPLC-fluorescence for the determination of heterocyclic amines in environmental simples*”. 12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis, Zaragoza, Octubre 2006.
5. A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Focussed Microwave-assisted solvent extraction prior to HPLC-Electrochemical Detection for the determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts*”. 6^o Congreso Internacional Química y Desarrollo Sostenible, Puerto de La Cruz, Diciembre 2006.
6. A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Ionic liquids as mobile phase additives in HPLC análisis of heterocyclic aromatic amines*”. XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica, Mallorca, Octubre 2007.

7. A. Martín-Calero, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Alkyl-imidazolium ionic liquids as additives in HPLC-Electrochemical detection for the determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts*”. IX Internacional Symposium on analytical methodology in the environmental field, Mallorca, Octubre 2007.

8. A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, “*Ionic liquids as desorption solvents and “memory effect” suppressors in heterocyclic aromatic amines determination by SPME-HPLC fluorescence*”. XIII International Symposium on Luminiscence Spectrometry (ISLS 2008), Bolonia (Italia), Septiembre 2008.

A.2. Artículos publicados

A continuación se recogen los Artículos Científicos derivados de esta Tesis.

HPLC

Experimental Design Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for the Determination of Heterocyclic Aromatic Amines by High-Performance Liquid Chromatography

Lourdes Cárdenes, Aurora Martín-Calero, Juan H. Ayala,
Venerando González, and Ana M. Afonso

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science,
University of La Laguna, La Laguna, Spain

Abstract: Solid-phase microextraction, using Carbowax-Templated Resin fiber, coupled with high performance liquid chromatography ultra violet/diode array detector (HPLC-UV/DAD) has been optimized for the determination of the heterocyclic aromatic amines (HAs). Three variables (absorption time, soaking time, and desorption time) were considered as factors in the optimization process. Interactions between analytical factors and their optimal levels were investigated using two level factorial and Doehlert matrix designs. Absorption time and soaking time were significant variables, and 15 min for each one of the variables was chosen for the best response. The optimized procedure allowed the determination of HAs with detection limits that ranged from 1.58 to 16.8 ng/L (except PhIP: 23.8 ng/L). The reproducibility of the method ($n = 5$), expressed as relative standard deviation was between 2.21% and

Received 7 July 2005; accepted 18 October 2005

This study was implemented as part of projects: ALG 2002-021149 financed by Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain); PI 2003/149 financed by Gobierno Autónomo de Canarias (Spain). A. Martín-Calero would like to thank the CajaCanarias fellowship.

Address correspondence to Ana M. Afonso, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of La Laguna, Campus de Anchieta, Astrofísico Francisco Sánchez s/n, E-38205, La Laguna, Spain. Fax: +34 922 318090; E-mail: aafonso@ull.es

28.3%. The method was applied to the analysis of a meat extract sample and the range of recoveries for the amines was 64.14%–112.72%.

Keywords: Solid-phase microextraction, high-performance liquid chromatography, optimization, heterocyclic aromatic amines, food analysis

INTRODUCTION

Heterocyclic aromatic amines (HAs) form one class of substances with strong mutagenic activity and, therefore, carcinogenic potential too. They are not present in foods but are formed during cooking and flavor processing of protein-rich foods such as meat and fish by condensation of amino acids, sugar creatinine, or creatine in a Maillard-type reaction (Van Dyck et al. 1995; Schwarzenbach and Gubler 1992). It has already been shown that both the type of meat and the cooking conditions, especially cooking temperature and cooking time, are the main parameters influencing types and amounts of HAs formed (Knize et al. 1998). Up to now about 20 HAs have been identified in cooked food (Wakabayashi et al. 1992). All 10 HAs tested so far proved to be carcinogenic in experimental animals with target organs including lung, liver, mammary gland, colon, and skin (Sugimura 1985; Ohgaki et al. 1991). The International Agency for Research on Cancer (IARC 1993) classified eight of the known HAs (MeIQ, MeIQx, PhIP, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, and Glu-P-1) as possible human carcinogens (class 2B) and IQ as a probable human carcinogen (class 2A).

Although numerous data on the amount of HAs in various cooked food products (Skog et al. 1997; Sinha et al. 1998; Zimmerli et al. 2001; Skog and Solyakov 2002), food flavors (Schwarzenbach and Gubler 1992) and soup cubes (Krach and Sontag 2000) have been reported in the past, it remains a challenging analytical task to obtain reliable data on the quantitative determination of HAs in complex food matrices at the ng/g level. Liquid chromatography with ultraviolet, electrochemical, or fluorescence detection (Gerbl et al. 2004; Ristic et al. 2004), liquid chromatography and gas chromatography coupled with mass spectrometry (Barceló-Barrachina et al. 2004a, 2004b; Skog et al. 1998), enzyme immunoassay and capillary electrophoresis (Sentellas et al. 2004; Mardones et al. 1998) have been used for this purpose. Nevertheless, due to the complexity of such matrices, clean-up and preconcentration procedures are usually needed to carry out the amine analysis. These methods are based on liquid-liquid extraction (Murray et al. 1993), extraction with blue cotton (Murkovic et al. 1998), solid-phase extraction (Galceran et al. 1996; Gross 1990) or immunoaffinity purification (Vanderlaan et al. 1993).

Solid phase microextraction (SPME), is a solvent-free extraction technique widely applied, mainly coupled to GC, to the monitoring of residues of organic compounds in a variety of matrices. It allows simultaneous

extraction and preconcentration of analytes from sample matrix. More recently, to widen its range of application to nonvolatile and thermally unstable compounds, SPME has been coupled with high-performance liquid chromatography (Chen and Pawliszyn 1995) and to capillary electrophoresis. However, the number of SPME-HPLC applications is still restricted compared to SPME-GC. Most of these applications were developed in last years (Zambonin et al. 2002; Zambonin 2003; Wu and Huang 1999; Chang et al. 2003), clearly indicating increasing interest in the technique.

Two applications of SPME-HPLC have been developed for the determination of mutagenic heterocyclic amines. Our research group carried out a comparative study with four different fiber coatings to evaluate their extraction efficiency in a previous work (Cárdenes et al. 2004). Moreover, an in-tube SPME method coupled with liquid chromatography has been developed for the analysis of mutagenic heterocyclic amines (Kataoka and Pawliszyn 1999).

In the development of SPME-HPLC method, one needs to adjust many variables in order to establish optimum conditions. This can be very time consuming if a conventional univariate optimization is undertaken manually and, where interactions exist between the variables, one is unlikely to find the true optimum. However, the optimization by multivariate techniques is faster, more economical, and effective than the traditional approach. Multivariate optimization generally implies two steps: a preliminary evaluation, using factorial designs to select the significant factors and, an appropriate estimation of the real functional relationship (response function) between the analytical response and significant factors to obtain the optimum values of these factors. In order to obtain the response function several approaches have been developed. Doehlert designs are included in second-order designs to obtain the response function. They are easily applied to optimize experimental variables (Dagnac et al. 1998; Aguilar et al. 1999; Bosque-Sendra et al. 2000; Ferreira et al. 2002; Zougagh et al. 2000; Nechar et al. 1999; Ferreira et al. 2003) and offer advantages in relation to more frequently used designs such as central composite or Box-Behnken. They need fewer experiments, which are more efficient and can be moved through the experimental field, and points obtained from a previous design could be used in later designs when they are adjacent (Bosque-Sendra et al. 1995). In addition the quantity of the levels related to each factor can be selected in order to obtain more information about significant or problematic factors (Hu and Massart 1989).

In the present paper, two-level factorial design and Doehlert matrix were used for the optimization of a SPME-HPLC method to determine HAs. Three variables (absorption time, soaking time, and desorption time) were considered as factors in the optimization process. A Carbowax-templated resin (50 μm) fiber for the SPME process, selected according to a previous work (Cárdenes et al. 2004) was used. The developed method at optimum conditions is evaluated with a commercial meat extract sample.

EXPERIMENTAL

Chemicals and Reagents

The compounds studied were as follows: 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-b]quinoxaline (MeIQx), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp-P-2), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b] indole (Trp-P-1), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b] indole (A α C), purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada), and 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b] indole (MeA α C) and 9H-pyrido[4,3-b] indole (NH), 1-methyl-9H-pyrido[4,3-b] indole (H) purchased from Aldrich. Stock standard solutions in methanol were prepared containing 80 μ g/mL of IQ, MeIQ, MeIQx, and H; and 400 μ g/mL of NH, Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, A α C, and MeA α C, and used for further dilutions.

All chemicals and solvents used were of HPLC or analytical-reagent grade, and water was purified using the Milli-Q gradient A10 system (Millipore, UK). All the solutions were filtered through a 0.45 μ m filter before being injected into the LC system.

Equipment

A SPME fiber assembly and SPME-HPLC interface with Rheodyne valve (Supelco, USA) were used to perform the microextraction.

The CW-TPR (50 μ m) fiber coating (Supelco, USA) has been used. The fiber was conditioned with the mobile phase until a stable baseline was obtained.

The HPLC equipment used was a liquid chromatograph consisting of a delivery solvent ProStar 230 and a photodiode array detector ProStar 330 (Varian, USA). Data were evaluated by the Star 5.51 chromatography workstation (Varian, USA).

For the statistical treatment the Statgraphics Plus for Windows V 4.2 software package (Statistical Graphics, Rockville) was used.

Chromatographic Conditions

The amines were separated by means of reverse-phase LC using a TSK-Gel ODS-80T_M column (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i.d.) (Tosoh Biosep, Germany) and a Pelliguard LC-18 guard column (Supelco, USA).

Optimal separation was achieved with a ternary mobile phase at flow-rate 1 mL/min, triethylamine phosphate 0.01 M at pH 3.2 (A solvent), acetonitrile (B solvent), and triethylamine phosphate 0.01 M at pH 3.6 (C solvent).

The gradient program was: 5–12% B in A, from 0 to 8.40 min; 12–25% B in C, 8.41–20 min; 25–50% B in C, 20–31.30 min; returning to initial conditions in 5 min with 5 min of post-run delay.

The UV detection was performed with a time program: 0–9.70 min, 254 nm; 9.70–11.50 min, 267 nm; 11.50–16.30 min, 263 nm; 16.30–20 min, 248 nm; 20–25 min, 263 nm; 25–28.50 min, 339 nm; 28.50–31 min, 343 nm.

Solid-Phase Microextraction Procedure

Aliquots of 4 mL of standard solutions containing a 0.9% of methanol or samples are placed in 4 mL glass vials, which are sealed with a septum-type cap. The fiber is directly immersed in the solution for 15 min at room temperature. Solutions are stirred ($800 \text{ cycles}\cdot\text{min}^{-1}$) with a stir bar.

After extraction, SPME fiber was introduced into the desorption chamber of the interface SPME-HPLC that is off-line under ambient pressure when the injection valve is in the load position. The chamber ($60 \mu\text{L}$) was previously full with initial mobile phase (A-B, 95:5), and the fiber was soaked for 15 min. Then the valve was switched to the inject position and the analytes were delivered to the column. The valve was returned to the load position after 1 min, then the chamber was flushed six times with $250 \mu\text{L}$ portions of B-C, 50:50, to minimize the possibility of analyte carry over, and then the SPME fiber was removed.

Sample Preparation

The SPME-HPLC method was applied to the determination of HAs in commercial meat extract samples. To carry out this analysis 1 g of commercial beef extract (Starlux) was spiked with standard compounds. Afterwards, the sample was dissolved in 2 mL of methanolic NaOH (0.1 N, NaOH:methanol, 7:3, v/v) and extracted during 15 min with sonication followed by centrifugation (4000 rpm, 20 min). An aliquot of supernatant (0.30 mL) was diluted to 10 mL with deionized water and analyzed according to the optimized procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

In a preliminary paper we present the application of SPME-HPLC to the analysis of HAs (Cárdenes et al. 2004). Three kinds of fiber coatings: Carbowax-Templated Resin (CW-TPR), Poly(dimethylsiloxane)-divinylbenzene (PDMS-DVB) and Polyacrylate (PA) were compared in order to evaluate extraction efficiency for heterocyclic aromatic amines. Effects of properties of the analytes and fiber coatings, pH, ionic strength,

and percentage of methanol in the sample solution were investigated. All the fibers were able to extract the HAs but CW-TPR was capable of the most efficient extraction. In fact, the relative extraction efficiencies of CW-TPR/PDMS-DVD and CW-TPR/PA, calculated as peak areas ratio, get values as 9.5 and 6.4 respectively. The CW-TPR fiber coating was then chosen for this experimental work.

Carry Over

Carry over in SPME is not of such a big concern as in many other methods because SPME is an equilibrium method. However, carry over may become a problem when the concentration of analyte in the following sample is so low that the equilibrium concentration in the coating is lower than the concentration caused by carry over from previous analysis (Gorechi and Pawliszyn 1995; Chang et al. 2003).

To study the carry over of heterocyclic amines using CW-TPR fiber coating we performed a study that consisted in cleaning up by flushing with of a mixture of the mobile phase 2, 4, 6, and 8 times, followed by desorption in the same conditions described earlier. For cleaning up a mixture of mobile phase, 50:50 B-C solvents was used.

It has been found that after four flushes: MeIQx, Trp-P-1, and A α C showed carry over lower than 1%; IQ, Harman, Trp-P-2 and MeA α C between 1%–5% and amines such MeIQ, Norharman, and PhIP ranged from 5%–15%. However, after six flushes with portions of 250 μ L of mobile phase we observed that the effect of carry over is not significant.

According to the obtained results, it is recommended that the fiber and the desorption chamber be cleaned up by flushing six times with 250 μ L volume of mobile phase to minimize the carry over. This routine would also reduce interface carry over, which can potentially be a significant problem.

Optimization of SPME-HPLC Method

The SPME-HPLC method has two steps. The first is the extraction of analytes from a sample matrix and the second is the desorption of these analytes directly delivered into HPLC column for further analysis.

To ensure extraction efficiency of analytes from the sample, one of the main steps is to determine the time that analytes need to reach equilibrium between sample matrix and coating of a fiber. The amount of analyte extracted onto the fiber depends not only on the polarity and thickness of the stationary phase, but also the extraction time and the concentration of the analytes in the sample. Factors that influence the equilibration period were investigated by Pawliszyn and co-workers (Louch et al. 1992; Arthur et al. 1992). It is not necessary to reach the equilibrium, shorter times can

be used as long as the extractions are timed carefully and the mixing conditions remain constants. However, the absorption time needs to be optimized for each application to reach a good balance between analysis time and peak response.

The desorption procedure is extremely important in SPME-HPLC, for this reason parameters of desorption process need also to be carefully optimized. In this case analytes with different polarity have to be desorbed from a fiber with a polar coating, which means analytes are more or less strongly absorbed onto the fiber. A static mode desorption was carried out and the mobile phase was chosen as the desorption solvent because it provides an easier performance. The fiber was soaked in the desorption chamber full of mobile phase for a fixed time (soaking time), then the valve was switched to the inject position and the analytes were delivered to the column. The fiber was flushed by mobile phase for a fixed time (desorption time) and the valve was returned to the load position.

For these reasons, absorption time, soaking time, and desorption time were considered in order to obtain the optimal conditions for maximum recovery of each compound.

A two-level full factorial design, 2^3 , involving 8 runs was used as a first approach to the response surface of the SPME process. Factorial designs at two-levels involve relatively few experiments for each variable, and unlike univariate options, they allow the detection and assessment of interactions among variables when the variables effects show nonadditivity.

The upper and lower values given to each factor were: 10 and 45 min; 3 and 10 min; and 0.5 and 5 min for absorption time, soaking time, and desorption time, respectively. Other variables implicated in the extraction were kept constant: sample pH (7) and percentage of methanol in the sample (0.6%).

Table 1 gives the experimental design matrix, and the results obtained in each run for the compounds studied, chosen peak area as response, are shown in Fig. 1. Results show that, the nine studied amines can be classified in two groups according to similar tendencies vs. the three factors considered.

Table 1. Design matrix in the factorial design (2^3)

Run	$t_{\text{absorption}}$	t_{soaking}	$t_{\text{desorption}}$
1	10	3	5
2	45	10	5
3	45	3	0.5
4	10	10	0.5
5	45	3	5
6	10	3	0.5
7	10	10	5
8	45	10	0.5

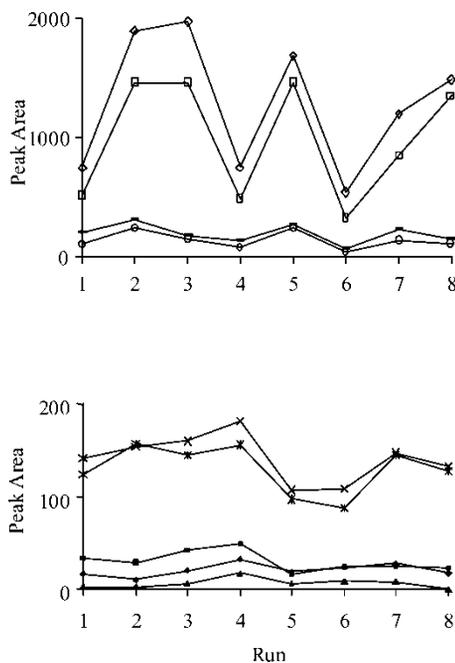


Figure 1. The results obtained in each run of the factorial design (2^3) for the compounds studied, chosen peak area as response. IQ (◆), MeIQ (■), MeIQx (▲), NH (×), H (★), Trp-P-2 (◇), Trp-P-1 (□), AαC (○) and MeAαC (-).

A group is constituted by polar amines (IQ, MeIQ, and MeIQx) and the other by less polar amines (Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, AαC, and MeAαC). Harman and Norharman show a particular behavior but similar to polar amines, so we have included them in this group.

The effects of main factors in the response are shown in Fig. 2, IQ and MeAαC have been chosen as representative examples of polar and less polar amines, respectively. Absorption time and desorption time have a negative effect in response while soaking time has a positive effect for polar amines. However, in case of less polar amines, all the factors show a positive effect. Figure 3 shows the interaction among factors. As can be seen, there is an interaction between absorption time and soaking time for both groups. For polar amines, the response reaches the maximum value when the absorption time is at its lowest level and the soaking time at the maximum. While for less polar amines, the response achieves the maximum for highest absorption time, the interaction with soaking time is less significant in this case.

In order to optimize the variables that have significant influence, absorption time and soaking time, a Doehlert design was carried out. Five levels for absorption time and three levels for soaking time were chosen. Central point

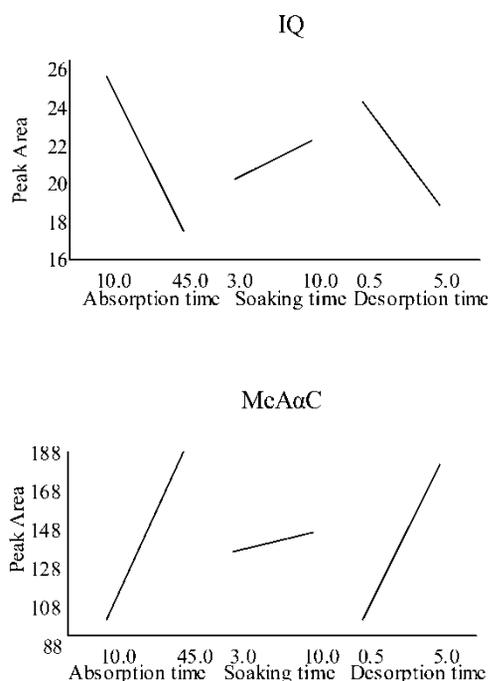


Figure 2. Main effects plot for IQ and MeAαC in the factorial design (2^3).

obtained was $t_{\text{absorption}}$ of 25 min and t_{soaking} 9 min. The desorption time was fixed to 1 min attending to the negative effect that this factor causes in the polar amines response and to the fact that these amines present lower sensibility. The seven experiments required by Doehlert matrix and the experimental results obtained for representative amines are grouped in Table 2.

This matrix allowed the estimation of coefficients (b) of a second-degree polynomial model as indicated by the following equation:

$$R = b_0 + b_1[t_{\text{absorption}}] + b_2[t_{\text{soaking}}] + b_{11}[t_{\text{absorption}}]^2 - b_{22}[t_{\text{soaking}}]^2 + b_{12}[t_{\text{absorption}}][t_{\text{soaking}}] \quad (1)$$

The coefficients values for each amine are shown in Table 3. The negative values for the corresponding coefficients obtained for the polar amines against the positive values obtained for the rest of the amines, show the negative effect that these factors have over the recoveries of those amines. This fact is probable caused by over absorption due to stronger interaction force between the analytes and the fiber.

There is a good agreement among the model-predicted values and the experimental values as can be seen in Table 2, where some representative amines are shown. The coefficients of multiple regression for the calculated

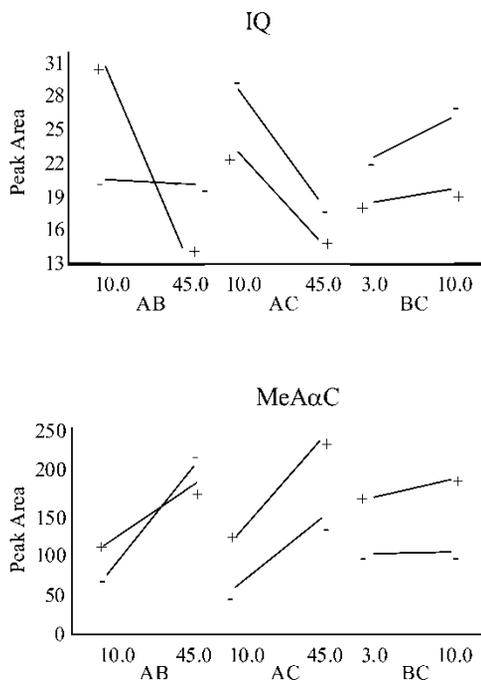


Figure 3. Interaction plot for IQ and MeA α C in the factorial design (2^3). Factors: A, Absorption time; B, Soaking time and C, Desorption time.

models range between 0.823 and 0.997 (except NH), being for most amines studied greater than 0.99, as it is shown in Table 3.

In Fig. 4 representative response surfaces are shown. The less polar amines show a maximum (optimum values) that falls within the experimental domain. The maximum values for absorption time and soaking time change from 25 to 45 min and 7.8 to 10.6 min, respectively, as can be seen in Table 3. On the contrary, the response surfaces for the polar amines do not show maxima within the experimental region covered by the design and the maximum recoveries are obtained for low absorption time (5 min) and high values of soaking time (15 min, except MeIQ x).

Given these findings and taking into account that polar amines show low sensibility, 15 min for absorption time and 15 min for soaking time were chosen.

Analytical Performance of the SPME-HPLC Method

Under the optimum conditions, 15 min for absorption time, 15 min for soaking time, and 1 min for desorption time, the analytical performance of the

Table 2. Doehlert matrix and the experimental and expected results for representative amines

Run	$t_{\text{absorption}}$	t_{soaking}	Response					
			IQ		NH		Trp-P-2	
			Experimental	Expected	Experimental	Expected	Experimental	Expected
1	45	9	27.8	26.6	202	186.5	2308	2352.5
2	35	15	31.8	33.0	183	198.5	2017	1972.5
3	35	3	30.9	32.1	179	194.5	2110	2065.5
4	25	9	33.3	33.3	216	216.0	1972	1972.0
5	5	9	57.3	58.5	161	176.5	604	559.5
6	15	15	50.5	49.3	193	177.5	1144	1188.5
7	15	3	49.1	47.9	221	205.5	1012	1056.5

Table 3. Coefficients values of the equations, coefficients of multiple regression and optimum values corresponding to each amine according to the model described

	IQ	MeIQ	MeIQx	NH	H	Trp-P-2	Trp-P-1	A α C	MeA α C
Coefficients									
b ₀	77.57	54.73	32.273	164.8	94.92	-793.0	-667.75	1.583	-62.39
b ₁	-1.937	-0.0983	-1.364	3.362	4.383	117.8	84.2	6.579	6.803
b ₂	-2.333	-0.4083	-0.0660	2.354	8.583	161.2	118.5	22.10	20.92
b ₁₁	0.0231	0.0012	0.0191	-0.086	-0.085	-1.29	-0.874	-0.0562	-0.0609
b ₂₂	0.1378	0.0674	-0.0053	-0.371	-0.653	-7.562	-5.191	-0.955	-0.868
b ₁₂	-0.0021	-0.0442	0.0079	0.1333	0.117	-0.938	-0.854	-0.0333	-0.0558
R	0.994	0.823	0.997	0.684	0.885	0.997	0.995	0.944	0.990
(t _{absorption}) _{Optimum}	5	5	5	25	32	42	44	45	45
(t _{soaking}) _{Optimum}	15	15	3	7.8	9.4	8	7.8	10.8	10.6

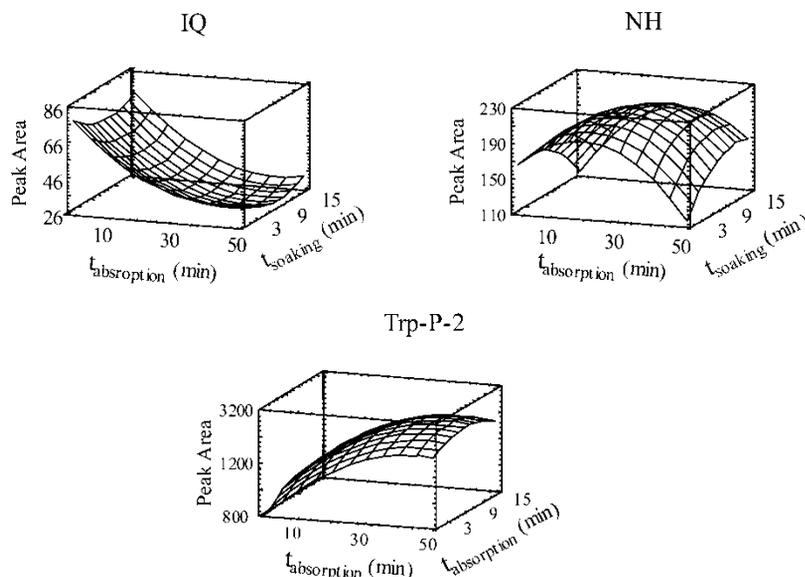


Figure 4. Response surfaces of estimated response function from Doehlert design.

SPME-HPLC procedure was evaluated. Table 4 shows the quality parameters of the method.

The linearity has been investigated over the ranges indicated in Table 4 for each amine. All amines showed good linearity with correlation coefficients varied between 0.982 and 0.999. The limits of detection of the SPME-HPLC method were between 1.58 ng/mL for Trp-P-2 and 23.8 ng/mL for PhIP, and they were calculated according to Cuadros et al. (1993). In general, less polar amines have lower detection limits than polar amines, with the exception of PhIP that shows the lowest calibration sensibility. Figure 5 shows a typical chromatogram obtained.

The precision was evaluated by performing five consecutive extractions for HAs concentrations indicated in Table 4. The RSD values ranged from 2.21% to 28.3%. In general, the poorest precisions were obtained for HAs with low sensibility.

Application in Food Sample

The method was applied to the determination of HAs in a meat extract sample in order to confirm its practicability and feasibility in the analysis of these amines in food samples. Commercial meat extract samples were spiked and treated according to the method described in the experimental section.

Table 4. Linearity, precision, and limits of detection for the optimized SPME-HPLC procedure

Compound	Linearity range (ng/mL)	Slope \pm SD	Intercept \pm SD	R	$S_{y/x}$	LOD (ng/mL)	RSD (%)
IQ	40.0–154	0.101 \pm 0.004	0.911 \pm 0.357	0.996	0.348	9.81	16.6 [80.0] ^a
MelQ	40.0–154	0.211 \pm 0.008	1.45 \pm 0.746	0.997	0.842	11.3	5.78 [80.0]
MelQx	40.0–154	0.069 \pm 0.005	0.202 \pm 0.595	0.990	0.411	16.8	28.3 [80.0]
NH	21.8–83.9	0.518 \pm 0.023	0.929 \pm 1.20	0.994	1.36	7.47	6.34 [43.7]
H	19.0–72.9	0.766 \pm 0.020	1.28 \pm 1.01	0.997	1.36	5.07	6.38 [38.0]
Trp-P-2	10.0–38.4	5.85 \pm 0.137	0.847 \pm 3.42	0.999	3.23	1.58	2.21 [20.0]
PhIP	40.0–154	0.094 \pm 0.008	2.08 \pm 0.848	0.987	0.800	23.8	9.65 [80.0]
Trp-P-1	10.1–38.9	4.88 \pm 0.244	0.967 \pm 7.31	0.992	5.91	3.43	5.84 [20.2]
A α C	20.0–76.8	1.18 \pm 0.026	0.170 \pm 1.24	0.998	1.33	3.24	8.65 [40.0]
MeA α C	20.0–76.8	0.908 \pm 0.071	0.086 \pm 3.69	0.982	4.17	13.1	8.21 [40.0]

^aAmine concentration in ng/mL.

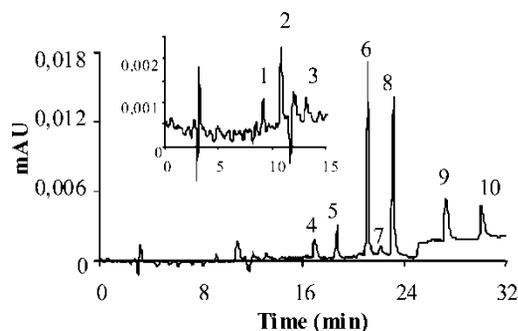


Figure 5. Chromatogram of a standard solution. Peaks: (1) IQ, (2) MeIQ, (3) MeIQx, (4) NH, (5) H, (6) Trp-P-2, (7) Trp-P-1, (8) AαC, and (9) MeAαC. For conditions, see text.

Table 5 summarizes the average recoveries and standard deviations obtained in repeated analysis of the spiked meat extract. The average recoveries were between 44.26% for Trp-P-1 and 139.1% for H. Seven amines showed recoveries higher than 70%, Trp-P-1 and Trp-P-2 gave the poorest recoveries, which is consistent with those reported by other authors (Skog et al. 1998). Figure 6 shows the chromatogram of the spiked meat extract.

Finally, the method was applied to the determination of HAs in an unspiked meat extract sample. Only, Harman and Norharman were detected at levels higher than their detection limits. Values of 360 and 207 ng/g were obtained for Harman and Norharman, respectively. These results are consistent with those obtained by other authors (Galceran et al. 1996).

Table 5. Average recoveries of HAs from a real sample (commercial meat extract)

Compound	Concentration ($\mu\text{g/g}$)	Recovery ^a \pm SD (%)
IQ	3.80	77.28 \pm 24.81
MeIQ	4.00	80.17 \pm 2.37
MeIQx	3.80	115.4 \pm 16.5
NH	1.95	81.71 \pm 0.99
H	1.72	111.72 \pm 26.76
Trp-P-2	1.50	48.87 \pm 3.18
PhIP	3.50	57.24 \pm 17.62
Trp-P-1	1.64	41.67 \pm 3.65
AαC	1.50	64.14 \pm 3.73
MeAαC	1.42	70.93 \pm 3.28

^aMean recovery of 3 independent extractions.

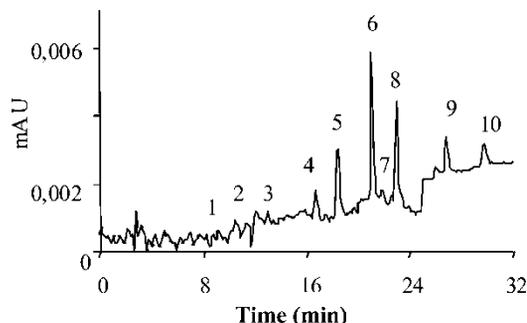


Figure 6. Chromatogram of the spiked meat extract sample. For conditions, see text.

CONCLUSIONS

The factorial designs were used to optimize variables affecting the micro-extraction process. The influence of absorption time, soaking time, and desorption time were studied to obtain optimal recovery efficiencies. The results obtained by applying the developed methodology to the HAs analysis in meat extract samples give recoveries higher than 70% in the majority of the amines studied. This method allows the simplification of the clean-up steps and eliminate different solid-phase extraction stages required in the analysis of HAs reducing the time required.

REFERENCES

- Aguilar, C., Peñalver, A., Pocerull, E., Ferré, J., Borrull, F., and Marcé, R.M. 1999. Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection. *J. Chromatogr. A*, 844: 425–432.
- Arthur, C.L., Killam, L.M., Buchholz, K.D., and Pawliszyn, J. 1992. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 64: 1960–1966.
- Barceló-Barrachina, E., Moyano, E., Puignou, L., and Galcerán, M.T. 2004a. Evaluation of different liquid-chromatography-electrospray mass spectrometry system for the analysis of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. A*, 1023: 67–78.
- Barceló-Barrachina, E., Moyano, E., Puignou, L., and Galcerán, M.T. 2004b. Evaluation of reversed-phase columns for the analysis of heterocyclic aromatic amines by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 802: 45–59.
- Bosque-Sendra, J.M., Nechar, M., Cuadros Rodríguez, L., and Molina, M.F. 1995. Optimization of analytical methods by using Doehlerts designs. *Anal. Proc.*, 32: 375–377.
- Bosque-Sendra, J.M., Nechar, M., and Molina, M.F. 2000. Experimental designs applied to solid-phase derivative spectrophotometry. *Mikrochim. Acta*, 134: 43–50.

- Cárdenes, L., Ayala, J.H., Afonso, A.M., and González, V. 2004. Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. *J. Chromatogr. A*, 1030: 87–93.
- Chang, W., Sung, Y., and Huang, S. 2003. Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 495: 109–122.
- Chen, J. and Pawliszyn, J.B. 1995. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 67: 2530–2533.
- Cuadros Rodríguez, L., García Campaña, A.M., Jiménez Linares, C., and Román Ceba, M. 1993. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Anal. Lett.*, 26: 1243–1258.
- Dagnac, T., Padró, A., Rubio, R., and Rauret, G. 1998. Optimisation of the extraction of arsenic species from mussels with low power focused microwaves by applying Doehlert design. *Anal. Chim. Acta*, 364: 19–30.
- Ferreira, S.L.C., dos Santos, H.C., Fernandes, M.S., and de Carvalho, M.S. 2002. Application of Doehlert matrix and factorial designs in optimization of experimental variables associated with preconcentration and determination of molybdenum in sea water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 17: 115–120.
- Ferreira, S.L.C., dos Santos, W.N.L., Becerra, M.A., Lemos, V.A., and Bosque-Sendra, J.M. 2003. Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimisation of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375: 443–449.
- Galceran, M.T., Pais, P., and Puignou, L. 1996. Isolation by solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of mutagenic amines in beef extracts. *J. Chromatogr. A*, 719: 203–212.
- Gerbl, U., Cichna, M., Zsivkovits, M., Knasmüller, S., and Sontag, G. 2004. Determination of heterocyclic aromatic amines in beef extracts, cooked meat and rat urine by liquid chromatography with coulometric electrode array detection. *J. Chromatogr. B*, 802: 107–113.
- Gorechi, J. and Pawliszyn, J. 1995. Sample introduction approaches for solid phase microextraction/rapid GC. *Anal. Chem.*, 67: 3265–3274.
- Gross, G.A. 1990. Simple methods for quantifying mutagenic heterocyclic aromatic amines in food-products. *Carcinogenesis*, 11: 1597–1603.
- Hu, Y. and Massart, D.L. 1989. Uniform shell designs for optimization in reversed-phase liquid-chromatography. *J. Chromatogr.*, 485: 311–323.
- IARC. 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Nr. 56, 163.
- Kataoka, H. and Pawliszyn, J. 1999. Development of in-tube solid-phase microextraction/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of mutagenic heterocyclic amines. *Chromatographia*, 50: 532–538.
- Knize, M.G., Sinha, R., Brown, E.D., Salmon, C.P., Levander, O.A., Felton, J.S., and Rothman, N. 1998. Heterocyclic amine content in restaurant-cooked hamburgers, steaks, ribs and chicken. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 4648–4651.
- Krach, C. and Sontag, G. 2000. Determination of some heterocyclic aromatic amines in soup cubes by ion-pair chromatography with coulometric electrode array detection. *Anal. Chim. Acta*, 417: 77–83.
- Louch, D., Motlagh, S., and Pawliszyn, J. 1992. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem.*, 64: 1187–1199.

- Mardones, C., Arce, L., Rios, A., and Valcárcel, M. 1998. Determination of heterocyclic aromatic amines in fried beefsteak, meat extract, and fish by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*, 48: 700–706.
- Murkovic, M., Steinberg, D., Pfannhauser, W., and Lebnsn, Z. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Unters. Forsch. A*, 207: 477–480.
- Murray, S., Lynch, A.M., Knize, M.G., and Gooderham, N.J. 1993. Quantification of the carcinogens 2-amino-3,8-dimethyl- and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in food using a combined assay based on gas chromatography-negative ion mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 616: 211–219.
- Nechar, M., Molina, M.F., and Bosque-Sendra, J.M. 1999. Application of Doehlert optimization and factorial designs in developing and validating a solid-phase spectrophotometric determination of trace levels of cadmium. *Anal. Chim. Acta*, 382: 117–130.
- Ohgaki, H., Takayama, S., and Sugimura, T. 1991. Carcinogenicities of heterocyclic amines in cooked food. *Mutat. Res.*, 259: 399–410.
- Ristic, A., Cichna, M., and Sontag, G. 2004. Determination of less polar heterocyclic aromatic amines in standardised beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 802: 87–94.
- Schwarzenbach, R. and Gubler, D. 1992. Detection of heterocyclic aromatic amines in food flavours. *J. Chromatogr.*, 624: 491–495.
- Sentellas, S., Moyano, E., Puignou, L., and Galcerán, M.T. 2004. Optimization of a clean up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1032: 193–201.
- Sinha, R., Rothman, N., Salmon, C.P., Knize, M.G., Brown, E.D., Swanson, C.A., Rhodes, D., Rossi, S., Felton, J.S., and Levander, O.A. 1998. Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food Chem. Toxicol.*, 36: 279–297.
- Skog, K. and Solyakov, A. 2002. Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol.*, 40: 1213–1221.
- Skog, K., Augustsson, K., Steineck, G., Stenberg, M., and Jägerstad, M. 1997. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked meat and fish products and their corresponding pan residues. *Food Chem. Toxicol.*, 35: 555–565.
- Skog, K., Solyakov, A., Arvidsson, P., and Jägerstad, M. 1998. Analysis of nonpolar heterocyclic amines in cooked foods and meat extracts using gas chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 803: 227–233.
- Sugimura, T. 1985. Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines forming during the cooking process. *Mutat. Res.*, 150: 33–41.
- Van Dyck, M.M.C., Rollmann, B., De Meester, C., and Layton, D.W. 1995. Quantitative estimation of heterocyclic aromatic amines by ion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 697: 377–382.
- Vanderlaan, M., Hwang, M., and Djanegara, T. 1993. Immunoaffinity purification of dietary heterocyclic amine carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, 99: 285.
- Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., and Sugimura, T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res.*, 52 (Suppl.): 2092–2098.
- Wu, U. and Huang, S. 1999. Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of aromatic amines. *Anal. Chem.*, 71: 310–318.

- Zambonin, C.G., Monaci, L., and Aresta, A. 2002. Solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography and diode array detection for the determination of mycophenolic acid in cheese. *Food Chem.*, 78: 249–254.
- Zambonin, C.G. 2003. Coupling solid-phase microextraction to liquid chromatography. *A Review. Anal. Bioanal. Chem.*, 375: 73–80.
- Zimmerli, B., Rhy, P., Zoller, O., and Schlatter, J. 2001. Occurrence of heterocyclic aromatic amines in the Swiss diet: analytical method, exposure estimation and risk assessment. *Food Addit. Contam.*, 18: 533–551.
- Zougagh, M., Cañada Rudner, P., García de Torres, A., and Cano Pavón, J.M. 2000. Application of Doehlert matrix and factorial designs in the optimization of the experimental variables associated with the on-line preconcentration and determination of zinc by flow-injection inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 15: 1589–1594.

Determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts Fast sample preparation method using solid-phase microextraction prior to high-performance liquid chromatography-fluorescence quantification

Aurora Martín-Calero, Juan H. Ayala, Venerando González, Ana M. Afonso*

*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of La Laguna, Campus de Anchieta,
Astrofísico Francisco Sánchez s/n, E-38205 La Laguna, Spain*

Received 12 May 2006; received in revised form 11 August 2006; accepted 14 September 2006
Available online 19 September 2006

Abstract

A procedure for the determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts using solid phase microextraction (SPME) coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection is presented. Analytes were first extracted from the samples using methanol/NaOH by an ultrasound-assisted method, and then concentrated on a Carbowax-templated resin (CW-TPR) SPME fiber. The extraction conditions such as extractant mixture composition, extraction time and extractions number, were optimized and the need of an extract freezing step previous to SPME is discussed. The detection limits under optimal conditions are in the range of 0.28–1.1 ng g⁻¹. The method was applied to the determination of less polar heterocyclic amines in four commercial meat extracts. Recovery values obtained are higher than 60% for the majority of amines.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase microextraction; High-performance liquid chromatography; Experimental design; Heterocyclic amines; Food analysis

1. Introduction

Many epidemiological studies have shown that 30–40% of cancers are related to diet [1,2]. Food can positively contribute to human carcinogenesis in two ways: the first is related to the presence of genotoxic chemicals as food contaminants, which can form DNA adducts, and the second involves natural food components, which can indirectly enhance the formation of mutagenic compounds in the thermal processing of foods.

Heterocyclic amines (HAs) are considered the main food mutagens in cooked meat products [3]. Their formation depends greatly on several factors including cooking temperature and duration, concentration of precursors, presence of enhancers or inhibitors, amount of lipids or water and pH [4–6].

The first references to HAs mutagens appeared more than 20 years ago. Up-to-date more than 20 HAs have been identified in cooked foods [7]. In 1993, the International Agency for Research of Cancer [8] classified nine of the known amines 2-

amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (AαC), 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeAαC), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), 2-amino-6-methyldipyrido [1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-1) and 2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2) as possible human carcinogens (class 2 B) and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) as a probable human carcinogen (class 2 A).

Many HAs have been identified in proteinaceous foods, such as cooked meats and fishes [9–13], meat extracts [14–16], cooking smoke [17], alcoholic drinks [18], coffee [10], and several foods. Likewise, they have been detected in environmental sources, as cigarette smoke [19,20], air, river water, and rain water. Some HAs have also been detected in industrial and biological fluids, like plasma, urine or bile [21].

To determine the importance of the consumption of HAs for human health, it is essential to quantify the amounts present in foods by means of reliable and quantitative methods. The considerable complexity of food matrices, the low concentrations

* Corresponding author. Tel.: +34 922318039; fax: +34 922318090.
E-mail address: aafonso@ull.es (A.M. Afonso).

present in HAs (ng g^{-1}) and the necessity to introduce successive stages to get appropriate selectivity, justify the laborious available analytical procedures.

Sample preparation procedures before the identification and quantification of mutagenic amines have several steps [22]. The first consists of a solution step, where the sample is homogenized and dispersed using different solvents. After the solution step, it often involves separation techniques such as centrifugation or filtration after protein precipitation. Further purification is carried out by one or various separation procedures including liquid–liquid extraction, column liquid chromatography, and solid phase extraction. Moreover, a preconcentration stage is required to achieve low detection limits. This is commonly performed by evaporating the final extract to dryness and redissolving the residue in a small volume of the appropriate solvent for the determination procedure.

The aim of this work is to develop a simple procedure for the determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts using solid phase microextraction (SPME) coupled to high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. SPME was chosen because it is faster than conventional extraction techniques and allows us to eliminate the use of organic solvents. The HAs determination was carried out by HPLC–fluorescence detection due to its sensitivity and selectivity for the less polar heterocyclic amines. The appropriate conditions for the solubilization of HAs contained in meat extracts, previous to the SPME step, were established and optimized. The method was applied to the determination of these compounds in commercial meat extracts.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The compounds studied were as follows: Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, A α C, purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) and MeA α C, 9H-pyrido[4,3-*b*]indole (NH), 1-methyl-9H-pyrido[4,3-*b*]indole (H) purchased from Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). The concentration of the standards solutions were $92 \mu\text{g mL}^{-1}$ of H; $520 \mu\text{g mL}^{-1}$ of NH and $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, A α C and MeA α C by direct measurement of the appropriate quantity of HAs and dissolved in methanol. The solutions were kept refrigerated at 0°C and protected from light. The stock solutions were used for further dilutions.

All chemicals and solvents used were of HPLC or analytical-reagent grade; water was purified using Milli-Q gradient A10 (Millipore, UK). All the solvents were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ Durapore[®] membrane filter (Millipore) before being used in the chromatographic system.

2.2. Equipment

The HPLC equipment used was a liquid chromatograph consisting of delivery solvent ProStar 230, equipped with SPME–HPLC interface with Rheodyne valve (Supelco, USA) to perform the microextraction. A Waters (Milford, MA, USA) 474

scanning fluorescence detector with a resolution of $\pm 2 \text{ nm}$ was used. Data were acquired and evaluated by the Star 5.51 chromatography workstation (Varian, USA). The analytical column was a TSKGel ODS-80TM column ($5 \mu\text{m}$, $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$ i.d.) (Tosoh Biosep, Germany), and a Pelliguard LC-18 guard column (Supelco, USA).

A Carbowax-templated resin (CW-TPR $50 \mu\text{m}$) fiber coating (Supelco) was used. The fiber was conditioned with the mobile phase until stable baseline was obtained.

Ultrasound-assisted extractions were performed with an ultrasonic bath Selecta (Hettich EBA 3S).

Statgraphics Plus V 4.2 software package (Statistical Graphics, Rockville) was used to generate the experimental design and data to analyze it.

2.2.1. Sample treatment

Meat extract samples were bought in a local supermarket. One gram of spiked and non-spiked meat extract samples were sonicated for 4.5 min at $41\text{--}44^\circ\text{C}$ with 3 mL of extractant phase (2.5% methanol and 0.05 M NaOH) in an ultrasonic bath with fixed power, followed by centrifugation (20 min, 4000 rpm). The supernatant was separated and placed into a 100 mL decantation funnel. The solid residue was subjected to a second extraction with 3 mL of extractant phase. Once all volumes of extractant phase were gathered, the funnel was placed in the freezer for 1 h at -18°C , to separate the fat of the sample. Approximately 5 mL were decanted and followed by centrifugation. An aliquot of 4 mL was placed in a glass vial for SPME under the described conditions.

2.2.2. SPME–HPLC procedure

Aliquots of 4 mL of standard solutions or samples with a total methanol content of 2.5% in NaOH 0.05 M are placed in 4 mL glass vials. These vials are sealed with a septum-type cap and the fiber is directly immersed in the solutions for 30 min at room temperature. Solutions are stirred ($800 \text{ cycles min}^{-1}$) with a small stirring bar to increase the rate of equilibration.

After extraction, the fiber is withdrawn into the needle, the needle is removed from the septum and is inserted in the desorption chamber of the interface SPME–HPLC that is off-line under ambient pressure when the injection valve is in load position. The chamber ($60 \mu\text{L}$) was previously filled with methanol and the fiber was soaked for 9 min (soaking time). Then, the valve was switched to inject position and the analytes were delivered to the column. The valve was returned to load position after 1 min (desorption time), then the chamber was flushed four times with $250 \mu\text{L}$ portions of mobile phase (B:C, 50:50) to minimize the possibility of analyte carryover, and then the SPME fiber was removed.

2.2.3. HPLC analysis

The chromatographic separation of HAs was carried out with a ternary mobile phase at a flow-rate 1 mL min^{-1} , triethylamine phosphate 0.01 M, pH 3.2 (A solvent), acetonitrile (B solvent) and triethylamine phosphate 0.01 M, pH 3.6 (C solvent). The gradient program was: 5–12% B in A, from 0 to 8.4 min; 12–25%

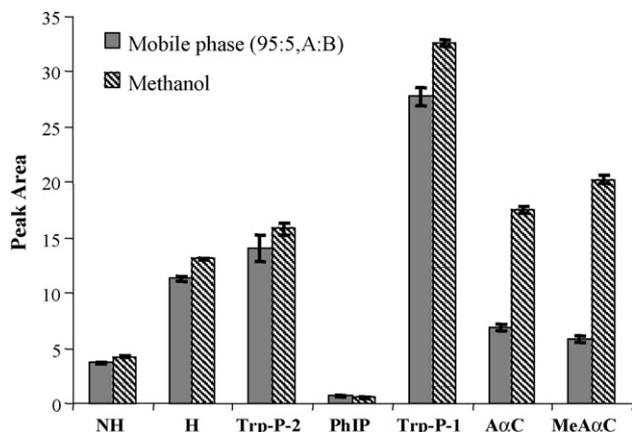


Fig. 1. Effect of solvent in desorption efficiency. Soaking time, 9 min and desorption time, 1 min. The results are the average of five replicates.

B in C, 8.4–20 min; 25–50% B in C, 20–31.3 min; returned to initial conditions in 5 min and 5 min of post-run delay.

The fluorescent detection was performed applying the following excitation and emission wavelength program: 270/450 nm from 0 to 14 min, 298/442 nm from 14 to 19 min (NH, H), 264/410 nm from 19 to 25 min (Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1), 343/386 nm from 25 to 32 min (AαC, MeAαC).

3. Results and discussion

3.1. SPME–HPLC fluorescence detection method

3.1.1. Optimal conditions for SPME–HPLC process

In preliminary works SPME coupled with HPLC–diode array detection (DAD) was successfully applied to determine a group of heterocyclic amines [23,24]. The parameters that affect both absorption and desorption process in SPME–HPLC, absorption time, soaking time, desorption time and solvent for static desorption, were optimized.

Considering the results obtained and the amines included in this study, the less polar heterocyclic amines, the following experimental conditions were chosen: absorption time 30 min, soaking time 9 min and desorption time 1 min. On the other hand, methanol was chosen as desorption solvent instead of mobile phase. In Fig. 1, the desorption efficiency, expressed as peak area, using methanol or HPLC mobile phase is compared. The methanol used as solvent leads to important increases in the desorption efficiency except for PhIP. This amine, which is the most lipophilic HAs, must have a higher affinity to the fiber polymeric phase.

To study the HAs carryover using the experimental conditions described above, the fiber and the desorption chamber were cleaned up by flushing with a mixture of mobile phase (50:50, B:C). It was followed by desorption under the same chromatographic conditions described in experimental section. The results show that after four flushes, NH did not show carryover and the rest of amines showed retentions lower than 0.5%. Fig. 2 shows the variation of the retention percentage of each amine with the number of flushes conducted. According to the obtained results, when samples of widely different concentra-

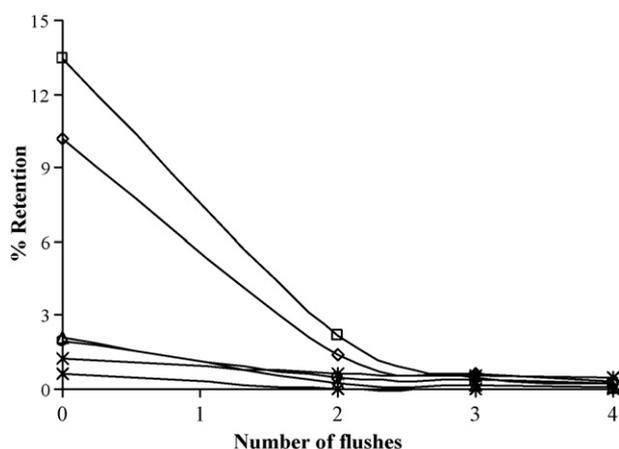


Fig. 2. Effect carryover using methanol as desorption solvent. Fiber and desorption chamber were cleaned up by flushing with mobile phase (50:50, B:C). NH (x), H (*), Trp-P-2 (◇), Trp-P-1 (□), AαC (△), MeAαC (○).

tions are analyzed in sequence, it is recommended that the fiber and the desorption chamber be cleaned up by flushing four times with 250 μL volume of mobile phase to minimize carryover.

To obtain the maximum fluorescence detector sensibility, the effect of the composition of mobile phase in the fluorescence behaviour of each amine was studied, and from maximum excitation and emission wavelengths obtained for each compound, the wavelength program mentioned in the Section 2 was chosen.

3.1.2. Quality parameters for SPME–HPLC fluorescence detection method

Under optimum conditions, SPME–HPLC fluorescence detection method has been validated. Table 1 shows the calibration parameters obtained for the quantification of these amines, including linearity range, determination coefficients (R^2) and detection limits (LOD) calculated as three-fold the standard deviation of residuals divided by the slope of the calibration curve.

The linearity of the method has been investigated over the ranges shown in Table 1 by triplicate injection at each concentration level ($n = 6$), showing in all cases a good correlation with R^2 values higher than 0.973. Detection limits ranged from 0.047 ng mL^{-1} for MeAαC to 0.190 ng mL^{-1} for PhIP. It should be highlighted that these detection limits are 40–100 times smaller than those obtained with HPLC–DAD [23,24].

To determine the inter-medium precision associated to the determination of each amine, three standard solutions with the concentrations shown in Table 1 were analyzed over three consecutive days. The obtained relative standard deviation (R.S.D.%) values ranged between 5.7 and 8.9%. In addition, the variance analysis of one factor shows that there is no significant difference among the results obtained in different days for all amines, with a significant level of 0.05.

3.2. Extraction of HAs from meat extracts

The SPME of heterocyclic amines, non-volatile compounds, in solid samples requires a previous solubilization step, in an

Table 1
Linearity, inter-medium precision and detection limits for the optimized procedure

Compound	Linearity range ^a (ng mL ⁻¹)	Slope ± S.D.	Intercept ± S.D.	R ²	LOD (ng mL ⁻¹) standard	LOD (ng g ⁻¹) sample	Inter-medium precision ^b R.S.D.%
NH	0.390–3.90	0.454 ± 0.012	-0.017 ± 0.026	0.994	0.099	0.59	8.9 (2.34)
H	0.345–3.45	1.396 ± 0.028	-0.137 ± 0.052	0.997	0.064	0.38	8.0 (2.07)
Trp-P-2	0.300–3.00	4.726 ± 0.137	-1.090 ± 0.228	0.992	0.085	0.51	8.1 (1.80)
PhIP	0.700–7.00	0.085 ± 0.003	0.020 ± 0.010	0.994	0.189	1.13	6.6 (4.20)
Trp-P-1	0.328–3.28	1.653 ± 0.097	-0.580 ± 0.180	0.973	0.186	1.12	6.1 (1.97)
AαC	0.300–3.00	4.741 ± 0.103	-0.422 ± 0.193	0.995	0.072	0.43	5.8 (1.80)
MeAαC	0.285–2.85	6.088 ± 0.111	-0.717 ± 0.163	0.997	0.047	0.28	5.7 (1.71)

^a Linear regression evaluated with $n=6$ concentration levels.

^b Run-to run ($n=3$) on day-to-day ($n=3$) samples analyzed. Values in parentheses are the concentration (ng mL⁻¹) used.

aquo- or aquo-organic medium. The studies directed to establish the appropriate conditions for the solubilization of HAs contained in meat extracts, were carried out using a meat extract sample. One gram of meat extract was spiked with known concentrations of HAs and stored in the dark and allowed to dry. Once the extract was spiked, a certain volume of extractant phase (NaOH–methanol in a composition that depends on the experiment) was added. The extraction was carried out in a glass reactor introduced into an ultrasound bath at 45 °C with fixed power during an extraction time, depending on the experiment. The extract was centrifuged and an aliquot (250 µL) was diluted to 10 mL with deionised water and analyzed according to the procedure described in Section 2.

Considering previous studies, there are several factors that can potentially affect the amines extraction efficiency: methanol percentage and NaOH concentration in extractant phase, and extraction time. Other variables such as quantity of sample (1 g), HAs spiked concentration in samples and extractant phase volume (3 mL) were kept constant.

A two-level full factorial design, 2³ with two central points, involving 10 runs was used as a first approach to the response surface of the HAs sonication extraction process [25]. The factors studied as well as their upper (+) and lower (–) values, were chosen according to previous experiments: 2.5 and 25% methanol in the extractant phase; 0.05 and 1 M NaOH in the extractant phase; and 5 and 20 min for extraction time. The experimental design parameters, as well as the obtained responses (peak areas) for the studied amines are shown in Table 2.

Table 2
Factorial design matrix and responses, expressed as peak areas

Run	% MeOH	[NaOH] (M)	Extraction time (min)	Response (peak area)						
				NH	H	Trp-P-2	PhIP	Trp-P-1	AαC	MeAαC
1	2.50	0.050	20.0	0.971	2.56	6.28	0.346	3.67	2.39	1.82
2	13.75	0.525	12.5	0.860	2.58	5.91	0.404	3.38	2.50	1.95
3	25.00	0.050	20.0	0.965	2.68	6.72	0.340	3.53	2.50	1.84
4	25.00	1.000	5.00	0.924	2.48	4.05	0.366	2.81	2.15	1.47
5	2.50	1.000	5.00	0.886	2.31	4.72	0.596	2.62	1.89	1.26
6	2.50	0.050	5.00	1.040	2.63	7.36	0.508	4.47	2.78	1.86
7	25.00	1.000	20.0	0.945	3.27	5.30	0.412	3.31	1.97	1.57
8	2.50	1.000	20.0	0.903	2.39	5.31	0.453	2.92	2.09	1.37
9	13.75	0.525	12.5	0.899	2.60	6.02	0.515	3.69	2.15	1.51
10	25.00	0.050	5.00	1.160	3.02	8.23	0.476	5.36	2.67	2.20

The effects of the main factors in the response for representative amines are shown in Fig. 3a. It can be observed that for most amines, the methanol percentage in the extractant phase has a positive effect, while NaOH concentration and extraction time present a negative effect, except H for which the extraction time presents a positive effect and PhIP that have an opposite behaviour in the methanol percentage and the NaOH concentration. Fig. 3b shows the interaction among factors. An interaction between NaOH concentration and extraction time exists for all the amines studied except for PhIP.

Variance analysis was used to estimate the significance of the main effects and their interactions. When a p -value is less than 0.05, the factor has a statistically significant effect at the 95% confidence level. The analysis of the results showed that the factor B (NaOH concentration) is statistically the most significant factor except for H and PhIP. The interaction B (NaOH concentration) × C (extraction time) is also statistically significant, while the rest of factors and interactions are not statistically significant.

In order to carry out an optimization of those factors that have a significant influence, and present a strong interaction among them (NaOH concentration in the extractant phase and extraction time), a central composite design, 2² + star with three central points, was applied [25]. This factorial design implies a total of 10 runs. The axial distance was fixed at 1.078 to establish the orthogonality condition. The methanol percentage in the extractant phase was fixed at 2.5%. Although the methanol percentage

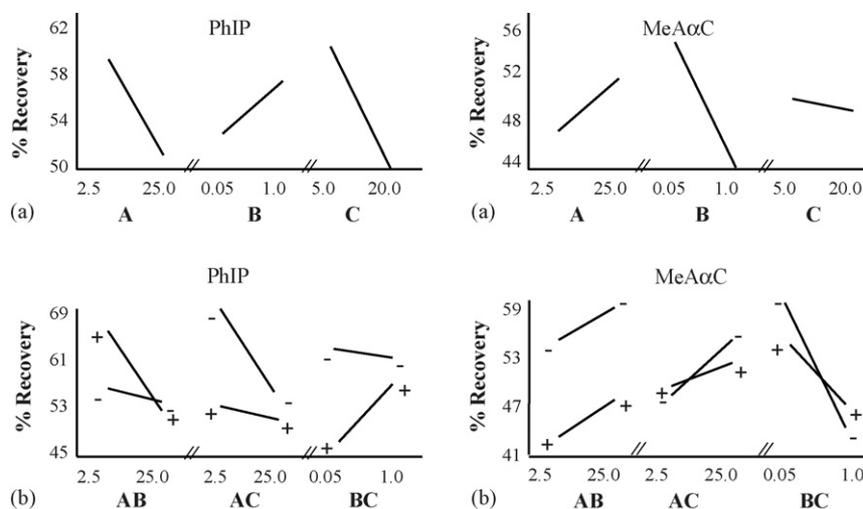


Fig. 3. Effects the main factors (a) and interaction among factors (b) for PhIP and MeA α C. (A) % methanol; (B) NaOH concentration (M); (C) extraction time (min).

Table 3
Experimental design matrix and responses, expressed as peak areas

Run	[NaOH] (M)	Extraction time (min)	Response (peak area)						
			NH	H	Trp-P-2	PhIP	Trp-P-1	A α C	MeA α C
1	0.010	7.000	0.413	0.47	3.08	2.10	2.010	6.28	5.54
2	0.050	7.000	1.25	3.00	6.70	2.07	3.74	5.77	5.12
3	0.052	4.500	1.12	3.02	9.48	2.11	5.43	5.92	5.72
4	0.050	2.000	1.23	1.96	6.29	1.74	3.37	5.19	4.20
5	0.030	1.804	1.14	1.78	6.70	1.96	3.39	4.81	4.29
6	0.008	4.500	0.47	0.78	3.45	2.40	2.18	6.81	6.16
7	0.030	4.500	1.00	1.56	4.73	2.32	2.49	5.97	5.21
8	0.030	4.500	0.977	1.38	5.13	2.20	2.83	5.45	5.06
9	0.030	7.195	1.08	1.89	6.00	2.39	3.47	5.34	4.98
10	0.010	2.000	0.600	0.836	4.08	2.51	2.80	7.28	6.77

in the extractant phase has a positive effect, it can have a negative effect in the later SPME.

The design matrix and the experimental results obtained for all amines are grouped in Table 3. This matrix allowed the estimation of coefficients of a second-degree polynomial model as indicated on the following equation:

$$R = b_0 + b_1[\text{NaOH concentration}] + b_2[\text{extraction time}] + b_{11}[\text{NaOH concentration}]^2 + b_{22}[\text{extraction time}]^2 + b_{12}[\text{NaOH concentration}][\text{extraction time}]$$

Table 4
Coefficients values of the equations, coefficients of multiple regression and optimum values corresponding to each amine according to the model described

	NH	H	Trp-P-2	PhIP	Trp-P-1	A α C	MeA α C
Coefficients							
b_0	0.498	1.016	3.690	2.451	2.944	8.161	7.473
b_1	42.00	9.166	65.86	-18.86	-20.23	-180.8	-180.2
b_2	-0.154	-0.153	-0.141	0.084	-0.109	0.244	0.318
b_{11}	-493.9	123.1	0.400	-110.3	686.3	1952.2	1740.2
b_{22}	0.012	-0.001	-0.017	-0.019	-0.008	-0.052	-0.068
b_{12}	1.045	6.980	7.055	3.730	5.370	7.900	10.73
R	98.93	95.01	76.76	81.29	67.03	89.63	87.78
[NaOH] _{optimum}	0.050	0.050	0.052	0.008	0.052	0.008	0.008
($t_{\text{extraction}}$) _{optimum}	7.195	7.195	6.449	3.035	7.195	2.964	3.000

The coefficients values for each amine and the optimum values for each factor are shown in Table 4. For the different studied amines, the optimum values for extraction time oscillate between 2.9 and 7.2 min, while the optimum values for NaOH concentration are 0.008 M for PhIP, A α C and MeA α C, and 0.05 M for the rest of amines. In general, high NaOH concentrations in the extractant phase bring a bigger extraction time.

Considering the obtained results, the chosen experimental conditions were: extraction time 4.5 min and NaOH concentration in the extractant phase 0.05 M.

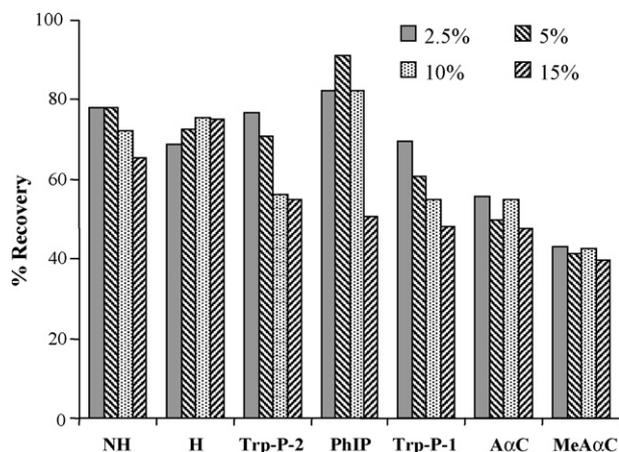


Fig. 4. Effect of methanol percentage in the mixture extractant on the extraction efficiency of HAs from meat extract.

3.2.1. Influence of methanol percentage and extractions number on the extraction efficiency

An increasing proportion of methanol in aqueous solution decreases the polarity of the aqueous sample, so the distribution constant between an aqueous phase and solid-phase coating decreases [26]. As a consequence, it may be necessary to determine the methanol percentage in the extractant mixture to reach optimum SPME conditions. To study this factor, a set of experiments was performed, working with the methanol percentages in the extractant mixture ranging between 2.5 and 15% (v/v), and with the optimum conditions established earlier. The obtained results showed in Fig. 4 reveal that in general, an increase in the methanol percentage involves a diminishing in the extracting efficiency. Given these precedents, we decided to work with an extractant mixture 0.05 M NaOH and 2.5% methanol.

Under the established experimental conditions, the recoveries ranged between 50 and 80%, being higher than 60% for most of the studied amines. To improve the obtained recoveries, the influence of the number of extractions was checked. When two serial extractions were performed, an important increase in the recoveries was obtained, mainly in the less polar amines. The recoveries can increase up to a 30%, except for PhIP, if two consecutive extractions are carried out.

To improve the detection limits of the proposed method, a solid phase microextraction by direct immersion of the fiber in the obtained extract (without later dilution) under optimum

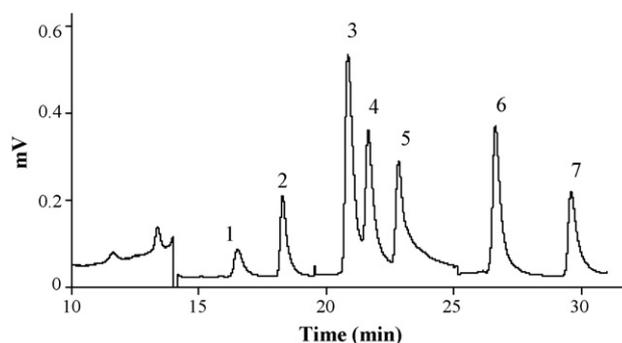


Fig. 5. Chromatogram of the spiked meat extract according with the optimal conditions. Peaks: (1) NH, (2) H, (3) Trp-P-2, (4) PhIP, (5) Trp-P-1, (6) AαC, (7) MeAαC.

conditions was carried out. Nevertheless, the high fat content of the samples used, led to low recoveries, probably due to the fiber coating poisoning. To minimize the fat content in the extract, it was frozen between -18 and -20 °C for 1 h [27,28]. Extract decantation was carried out and the fiber was directly immersed to perform the solid phase microextraction.

Fig. 5 shows a representative chromatogram after the direct immersion. The chromatogram shows the low sample matrix interference in the analytical peaks of interest. It allows the determination of HAs in meat extract at low part-per-billion. The obtained detection limits are given in Table 1 and ranged from 0.28 to 1.13 ng g^{-1} . These results are comparable with those obtained by HPLC–mass spectrometry [29] or gas chromatography–mass spectrometry [30].

3.3. Determination of HAs in meat extracts

In order to evaluate the applicability of the proposed method, recovery studies in different types of meat extracts were carried out. Table 5 shows the obtained recoveries for the two studied samples, spiked at two concentration levels included within the linearity interval of the analytical curves of the method.

The obtained recoveries depend on the sample nature and the spiked concentration level. In general, the best recoveries were obtained for high amines concentrations, with values between 60.4 and 132.8%, and standard deviations between 5.6 and 19.9%. The exception was MeAαC, which presented low recoveries, between 33.3 and 51.6% at the highest spiked level, and between 21.5 and 28.7% at the lowest spiked level. The

Table 5
Recovery of less polar heterocyclic amines standards from spiked samples

Compound	Target concentration (ng g^{-1})	Recovery (%)		Target concentration (ng g^{-1})	Recovery (%)	
		Meat extract (A)	Soup cubes (C)		Meat extract (A)	Soup cubes (C)
NH	7.8	116.5 ± 19.9	56.2 ± 7.10	24.6	107.8 ± 14.4	71.8 ± 7.60
H	6.9	68.2 ± 5.80	63.5 ± 7.50	22.8	61.4 ± 6.60	67.4 ± 5.60
Trp-P-2	6.0	62.0 ± 6.90	49.4 ± 7.60	16.1	109.4 ± 8.70	98.5 ± 7.90
PhIP	7.1	105.8 ± 15.5	76.5 ± 14.8	14.0	109.6 ± 19.9	75.5 ± 10.9
Trp-P-1	6.5	77.2 ± 14.9	59.2 ± 16.5	15.7	130.5 ± 18.6	132.8 ± 14.8
AαC	6.0	53.8 ± 10.4	41.1 ± 6.40	18.9	66.8 ± 5.60	60.4 ± 6.00
MeAαC	5.7	28.7 ± 2.80	21.5 ± 4.70	19.2	51.6 ± 4.00	33.3 ± 4.50

Confidence intervals expressed as standard deviations ($n = 3$).

Table 6
Concentration (ng g⁻¹) of less polar heterocyclic amines (ng g⁻¹) in commercial meat extract samples^a

Compound	Meat extract (A)	Chicken extract (B)	Soup cubes (C)	Soup cubes (D)
NH	56.0	7.76	D/NQ	65.6
H	6.65	D/NQ	D/NQ	3.92
Trp-P-2	2.03	3.13	D/NQ	D/NQ
PhIP	7.42	ND	ND	D/NQ
Trp-P-1	4.02	D/NQ	D/NQ	D/NQ
AαC	D/NQ	D/NQ	D/NQ	D/NQ
MeAαC	D/NQ	D/NQ	D/NQ	D/NQ

^a The values not corrected by percent recovery. The data given are the mean values of two determinations. ND: not detected. D: detected. NQ: not quantified.

quantification of this amine was particularly complicated due to the high number of interferences present at its retention time. This problem has been described by other authors [14,31–33]. The lowest recoveries for all amines are obtained with the soup cubes (C) at the lowest spiked level, varying from 21.5 to 76.5%. It should be also noted that the highest standard deviations at the lowest spiked level correspond to amines already present in the sample, like NH, PhIP and Trp-P-1.

Finally, the method was applied to HAs determination in four samples of meat extracts without spiking. Table 6 shows the levels of some amines in the analyzed samples. High NH content is observed in three of the examined samples.

The found values oscillate between 2.03 and 65.6 ng g⁻¹ for Trp-P-2 and NH, respectively. These results are in conjunction with the ones obtained by other authors [14,31–33].

In the case of meat soup cube (C), all the amines except PhIP were detected, but at concentrations lower than its quantification limits. On the other hand, AαC and MeAαC were detected in all extracts but they could not be quantified.

4. Conclusions

The proposed method simplifies considerably, compared to other methodologies, the treatment of samples that contain high quantities of fat and very low contents of heterocyclic amines. With such a purpose it has been important the freezing treatment used for the separation of the fat contained in the extracts coming from the solubilization step. It is also important the contribution of the solid phase microextraction, used to transport the amines from the extractant solution to the interface of the HPLC system that allows the injection in the analytic column.

On the other hand, making use of the natural fluorescence of the studied amines, we propose the use of the fluorescence as detection technique, which also presents the advantages of selectivity and, especially of sensibility, that usually accompany to its measurements.

Consequently, the proposed method combines the rapidity provided by the freezing treatment of the extracts, the efficiency and rapidity of the solid phase microextraction, and the sensibility of the fluorescent detection, to get fast and sensitive determinations of heterocyclic amines present in food products with high contents in fat.

The method is suitable for the determination of the less polar heterocyclic amines, at ng g⁻¹ levels, in commercial meat extracts with good recoveries. Also, the method could be adapted to carry out studies of screening of heterocyclic amines in unknown samples.

Acknowledgments

This study was implemented as part of projects: ALG 2002-021149 financed by Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain); Pi 2003/149 financed by Gobierno Autónomo de Canarias (Spain). Aurora Martín-Calero would like to thank the Caja Canarias fellowship.

References

- [1] T. Sugimura, *Carcinogenesis* 21 (2000) 387.
- [2] L.R. Ferguson, *Mutat. Res.* 443 (1999) 1.
- [3] K.I. Skog, M.A.E. Johansson, M.I. Jägerstad, R.H. Adamson, J.A. Gustaffson, I. Noboyuki, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Y. Yamazoe, *Heterocyclic Amines in Cooked Foods, Possible Human Carcinogens*, Princeton Scientific Publishing Co. Inc., Princeton, New York, 1995.
- [4] K.I. Skog, *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 655.
- [5] K.I. Skog, M.A.E. Johansson, M.I. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 879.
- [6] S. Robbana Barnat, M. Rabache, E. Riolland, J. Fradin, *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 280.
- [7] K. Wakabayashi, M. Nagao, H. Esumi, T. Sugimura, *Cancer Res.* 52 (1992) 2092.
- [8] IARC Monographs of the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56, 1993.
- [9] P.A. Guy, E. Gremaud, J. Richoz, R.J. Turesky, *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 89.
- [10] S. Casal, E. Mendes, J.O. Fernandes, M.B.P.P. Oliveira, M.A. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 105.
- [11] C.M. Lan, T.H. Kao, B.H. Chen, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 27.
- [12] C. Messner, M. Murkovic, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 19.
- [13] L. Warzecha, B. Janoszka, U. Błaszczak, M. Stróżyk, D. Bodzek, C. Dobosz, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 95.
- [14] E. Barceló-Barrachina, F.J. Santos, L. Puignou, M.T. Galceran, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 209.
- [15] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 307.
- [16] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 101.
- [17] H.P. Thiébaud, M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, D.P. Hsieh, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 821.
- [18] E. Richling, C. Decker, D. Haring, M. Herderich, P. Schereier, *J. Chromatogr. A* 791 (1–2) (1997) 71.
- [19] Y. Totsuka, H. Ushiyama, J. Ishihara, R. Sinha, S. Goto, T. Sugimura, K. Wakabayashi, *Cancer Lett.* 143 (1999) 139.
- [20] T.A. Sasaki, J.M. Wilkins, J.B. Forehand, C. Moldoveanu, *Anal. Lett.* 34 (2001) 1749.
- [21] K. Wakabayashi, H. Ushiyama, M. Takahashi, H. Nukaya, S.B. Kim, M. Hirose, M. Ochiai, T. Sugimura, M. Nagao, *Environ. Health Perspect.* 99 (1993) 129.
- [22] F. Toribio, M.T. Galceran, L. Puignou, *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 171.
- [23] L. Cárdenes, A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Lett.* 39 (2) (2006) 405.
- [24] L. Cárdenes, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 87.
- [25] C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 1991 (Chapter 11).

- [26] C.L. Arthur, L.M. Killan, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1960.
- [27] M. Yamada, M. Miyata, Y. Kato, M. Nakamura, M. Nishijima, T. Shibata, Y. Ito, *Shokunin Eiseigaku Zasshi* 34 (1993) 635.
- [28] C. Gertz, K. Hermann, *Lebensm Unters Forsch* 177 (1983) 186.
- [29] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 267.
- [30] K. Skog, A. Solyakov, P. Arvidsson, M. Jägerstad, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 227.
- [31] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 203.
- [32] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223.
- [33] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 207.

Focused Microwave-Assisted Extraction and HPLC with Electrochemical Detection to Determine Heterocyclic Amines in Meat Extracts

**Aurora Martín-Calero, Verónica Pino, Juan H. Ayala,
Venerando González, and Ana M. Afonso**

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science,
University of La Laguna. Campus de Anchieta, Astrofísico Francisco
Sánchez s/n, La Laguna, Spain

Abstract: A method for the determination of 11 heterocyclic amines (HAs) in meat extracts by high performance liquid chromatography with electrochemical detection is proposed. The chromatographic method is optimized to obtain both polar and less polar amines in the same chromatographic run, which is a difficult task when using electrochemical detection. The extraction of the meat extracts is carried out using a focused microwave system, a technique applied for first-time in the extraction of these analytes. The microwave extraction process takes only 5 minutes, an improvement on the extraction times for methods commonly applied to heterocyclic amines in food samples. This screening method allows us to determine HAs in meat extracts with average recoveries of 81.2%, 76.4%, 66.7%, 60.3%, and 63.8%, for granulated meat extract, non-granulated meat extract, chicken extract, and soup cubes (brands A and B), respectively. The proposed method has an intermediate precision ranging from 6.1 to 12.8%, and detection limits between 0.16 and 2.68 ng.

Keywords: Heterocyclic amines, High performance liquid chromatography, Electrochemical detection, Focused microwave-assisted extraction, Meat extracts

Address correspondence to Ana M. Afonso, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of La Laguna. Campus de Anchieta, Astrofísico Francisco Sánchez s/n, E-38205 La Laguna, Spain. E-mail: aafonso@ull.es

INTRODUCTION

Heterocyclic amines (HAs) are compounds that are formed naturally in proteinaceous foodstuffs when exposed to heat during the cooking process at common household cooking temperatures.^[1–3] These compounds are known for their potent mutagenic response and they have also been linked to cancer in laboratory rodents and non-human primates.^[4,5] Some of these amines have been classified as possible human carcinogens (class 2B) and one of them as probable human carcinogen (class 2A), by the International Agency for Research on Cancer (IARC).^[6] Therefore, a reliable method is needed to quantify these analytes in cooked foods in order to assess the risks to human health by their intake. It is widely recognized that diet is a major life style factor contributing to the risks of cancer.^[7–9]

The determination of heterocyclic amines has been carried out using various techniques such as high performance liquid chromatography (HPLC) with ultra-violet (UV),^[10] electrochemical (ECD),^[11] fluorescence (FD),^[12] and mass spectrometry (MS)^[13] detection, as well as gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS),^[14] capillary electrophoresis,^[15] and enzyme linked immunosorbent assay.^[16] Although HPLC-MS and GC-MS are selective and sensitive techniques, they require sophisticated and expensive equipment that is beyond the reach of many laboratories. In this sense, HPLC-ECD is an option to be considered as an alternative by its selectivity and sensitivity. In addition, the ECD avoids the use of phase mobile additives like triethylamine.^[17] Electrochemical detection of HAs is based on the oxidization of these compounds at the operating potential. Isocratic elution is usually employed in the combination with HPLC-ECD.^[11,18,19] The isocratic elution has the disadvantage that two different methods (different runs) are required in order to determine polar and less polar amines.

Although, numerous data on the amounts of HAs in various cooked foods have been reported in the past,^[20–22] it remains a challenging analytical task to obtain reliable data on their quantitative determination at low levels of concentration. Therefore, it is not too much to say that the cleanup procedures for complex samples like meat extracts greatly influence the reliable and accurate analysis for these compounds. Several enrichment steps have been performed before the chromatographic analysis when analyzing HAs. Liquid-liquid extraction (LLE),^[23,24] and mainly solid-phase extraction (SPE),^[11,25] are the most commonly used techniques. These methods have several disadvantages: they are tedious, labor intensive, and time consuming. More recently, the solid-phase microextraction^[26–28] has also been utilized. The microwave-assisted extraction has been widely used to extract different analytes from a number of solid matrixes.^[29,30] Most experiments have been carried out using cavity, or to a lesser extent, focused microwave systems. To our knowledge, this extraction technique has not been applied to the analysis of heterocyclic amines despite its well-known advantages.

This paper offers a new focused microwave-assisted extraction method combined with HPLC-ECD for the determination of eleven heterocyclic

amines in commercial meat extracts. Furthermore, the chromatographic method is carried out to determine polar and less polar amines in the same chromatographic run by applying gradient elution with ECD and, therefore, reducing the chromatographic time. The novel combination with microwaves also results in a high reduction of the extraction time: around 5 minutes for the microwave extraction step. The proposed method is fast, effective, and allows us to determine low levels of HAs in highly complex matrixes like meat extracts. The optimization of the microwave extraction process was developed by means of an experimental design, in order to decrease the optimization time.

EXPERIMENTAL

Reagents

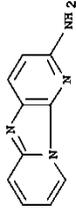
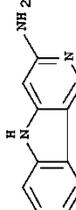
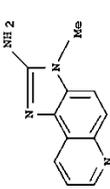
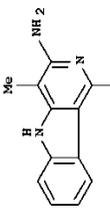
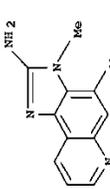
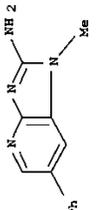
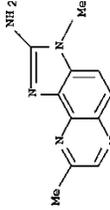
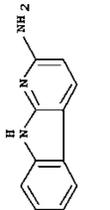
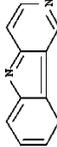
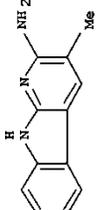
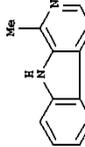
The studied amines were: 2-aminodipyrdo[1,2-a:3',2'-d]imidazole (Glu-P-2), 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-*f*]quinoline (MeIQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx) 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-*b*]pyridine (PhIP), 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (AαC), purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada), and 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeAαC), 9*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (NH) and 1-methyl-9 *H*-pyrido[4,3-*b*]indole (H), purchased from Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). Their structures can be observed in Table 1. Stock standard solutions of these amines were prepared containing 100 μg/mL of IQ; 420 μg/mL of MeIQ and Glu-P-2; 90 μg/mL of MeIQx; 620 μg/mL of NH; 140 μg/mL of H; 400 μg/mL of Trp-P-1; 380 μg/mL of Trp-P-2 and PhIP; 230 μg/mL of AαC and 200 μg/mL of MeAαC in methanol. The solutions were kept in the dark and refrigerated at 0°C. These stock standard solutions were used for the preparation of working standard solutions.

All chemicals and solvents were of HPLC or analytical-reagent grade. Water was purified using Milli-Q gradient A10 (Millipore, UK). All the solvents were filtered through a 0.45 μm Durapore® membrane filter (Millipore) before being used in the chromatographic system.

Instrumentation

Focused microwave-assisted extractions were performed at atmospheric pressure at the standard frequency of 2450 MHz using a CEM Focused Microwave™ Synthesis System apparatus, model Discover (CEM corporation, Matthews, NC, USA) equipped with an infrared temperature control system, stirring, and cooling options. The cooling was carried out by means of an air flow. The ChemDriver™ software (CEM) was used for data acquisition.

Table 1. Studied amines with their structures

Compound	Abbreviation	Structure	Compound	Abbreviation	Structure
2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i>]imidazole	Glu-P-2		3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole	Trp-P-2	
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline	IQ		3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole	Trp-P-1	
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline	MeIQ		2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine	PhIP	
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	MeIQx		2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indole	AαC	
9 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole	NH		2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indole	MeAαC	
1-Methyl-9 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole	H				

The HPLC equipment was a liquid chromatograph consisting of a delivery solvent ProStar 230 (Varian, California, USA) equipped with a Rheodyne valve (Supelco, Bellefonte, USA) of 20 μ L. The detection of HAs was carried out using a ProStar 370 Electrochemical Detector (Varian). It was provided with a working electrode (glassy carbon), a reference electrode (Ag/AgCl, 2 M), and an auxiliary electrode (stainless steel). The analytical columns were two TSK GelODS-80TM columns (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm i.d.) (Tosoh Biosep, Stuttgart, Germany), and a Pelliguard LC-18 guard column (Supelco). Data were acquired with the Star 5.51 chromatography workstation software (Varian).

The Statgraphic Plus (Statistical Graphics, Rockville) software package, version 5.1, was used for the statistical treatment.

Procedures

Meat extract samples were bought in a local supermarket. The extraction process of meat extracts was as follows: 6 mL of extractant phase (2.5% methanol in 0.05 M NaOH) were added to 1 g of meat extract sample (spiked or non-spiked) placed in a Pyrex[®] tube of 40 mL. After ensuring that an agitation bar was placed, the extraction tube was introduced into the microwave cavity. The optimum extraction was performed under a maximum radiation of 20 W (microwave oven power). Samples were exposed to microwaves until the temperature reached 80°C, and then kept to this temperature during 1 minute. The total microwave extraction time took around 5 minutes. The sample was kept stirring during the entire microwave extraction step. Afterwards, the tube was allowed to cool at room temperature. The supernatant was then separated and placed into a 100 mL decantation funnel. The funnel was placed in the freezer for 1 hour at -18°C . This purification step was required for the removal of lipids and fats. Approximately 3 mL were then decanted, followed by centrifugation. An aliquot of 2 mL (already centrifuged) was diluted to 5 mL with deionized water and analyzed according to the optimal HPLC procedure.

The spiking process of the meat extract was as follows: the spiking solution was slowly added to form a dough, which was mechanically stirred for several minutes. Afterwards, it was stored in the dark for 24 hours. The spiked levels were: 25 $\mu\text{g/g}$ for MeA α C; 20 $\mu\text{g/g}$ for Glu-P-2, MeIQ and NH; 18 $\mu\text{g/g}$ for IQ and A α C; 16 $\mu\text{g/g}$ for MeIQx; 12 $\mu\text{g/g}$ for PhIP; 10 $\mu\text{g/g}$ for Trp-P-1; and 6 $\mu\text{g/g}$ for H and Trp-P-2.

HPLC Analysis

The chromatographic separation of the HAs was carried out with a ternary mobile phase: 50 mM ammonium acetate (pH = 4.0):acetonitrile (90:10) (A solvent),

50 mM ammonium acetate (pH = 6.0):acetonitrile (70:30) (B solvent) and 50 mM ammonium acetate (pH = 6.0):acetonitrile (60:40) (C solvent), at a flow rate of 1 mL/min. The gradient program was: 100% A, from 0 to 27 min; 0–100% B, from 27 to 30 min; 100% B, from 30 to 44 min, 0–100% C, from 44 to 45 min; and 100% C, from 45 to 63 min; returned to initial conditions in 8 min, with 5 min of post-run delay. The columns and the detector were thermostated at 25°C.

The working potentials of the electrochemical detector were set at + 1000 mV for the polar fraction (from 0 to 34.3 min) and at + 950 mV for the less polar fraction (from 34.3 to 63 min).

RESULTS AND DISCUSSION

Chromatographic Separation

The chromatographic conditions were optimized to achieve an adequate resolution of the target HAs. The aim of the separation was to obtain both polar and less polar amines in the same chromatographic run, instead of using two different chromatographic methods.^[11,18,19] In this way, an appropriate optimization of the gradient elution conditions was carried out. An adequate separation was obtained when using a ternary mobile phase, as has been described in the experimental section. These conditions are summarized in Table 2. The total chromatographic time was 63 minutes. When using 2 different chromatographic methods, and the same kind of column,^[31] the total chromatographic time was 80 minutes: 50 minutes (first chromatogram for polar amines) plus 30 minutes (second chromatogram for less polar amines), and this is without considering the time required to reequilibrate the system between both methods. Therefore, a great decrease of the chromatographic time was obtained with the proposed method, which is very interesting for screening purposes. Figure 1 shows a representative chromatogram obtained under the optimal conditions.

Optimization of the Focused Microwave Extraction Process

The microwave-assisted extraction has turned out to be a highly useful analytical tool for the extraction of analytes from solid samples, mainly by its extraction efficiencies, as well as by the low extraction times achieved with this technique.^[29,30] In this way, it seems interesting to make use of this technique for the analysis of HAs, in order not only to diminish the experimental times required in the tedious procedures described for their extraction,^[32] but also to get appropriate extraction effectiveness from complex samples. The focused microwave was selected over the conventional microwave for having several advantages, such as the safety due to operate at atmospheric pressure or the

Table 2. Optimal chromatographic conditions for the studied amines and their retention times. The rest of chromatographic conditions as described in the experimental section

Time (min)	Mobile phase			Amine (Retention time \pm SD ^a)	E (mV)
	% A	% B	% C		
0	100			Glu-P-2 (11.24 \pm 0.66) IQ (16.80 \pm 1.22) MeIQ (22.22 \pm 1.50)	+1000
27	100			MeIQx (28.72 \pm 1.54)	
30		100		NH (37.18 \pm 0.38) H (38.18 \pm 0.20) Trp-P-1 (39.33 \pm 0.16) Trp-P-2 (41.94 \pm 0.20)	+950
44		100			
45			100	PhIP (45.66 \pm 0.36) A α C (52.95 \pm 0.31) MeA α C (60.16 \pm 0.44)	
63			100		

^aStandard deviation for n = 11.

possibility of using programmable addition of reagents at any time during the extraction.^[33]

The optimization of the focused microwave-assisted extraction was carried out by means of the experimental design. The use of a factorial design to explore the variables that affect the microwave extraction allows a

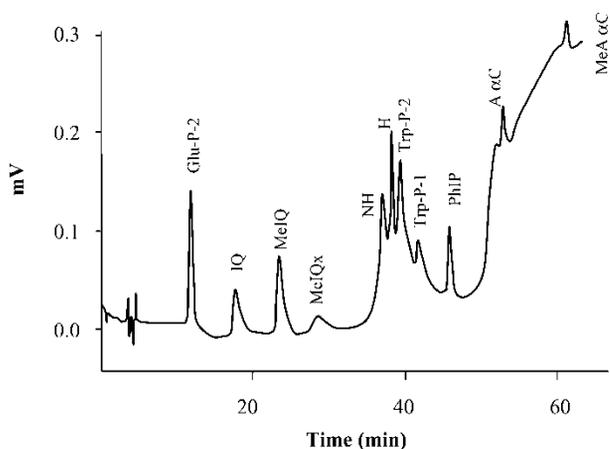


Figure 1. Representative chromatogram for the studied HAs, obtained by HPLC-ECD under the experimental conditions described in the text.

consideration of the overall number of experiments and possible interaction effects between the variables. The application of a statistical approach using a factorial design can both reduce the development time and provide less ambiguous data. Several variables could potentially affect the microwave extraction process, like the microwave oven power, the maximum temperature to be reached inside the extraction tube, and the hold time (that is, the fixed time where the maximum temperature is kept constant inside the extraction tube). Other variables implicated in the extraction process were kept constant: amount of sample (1 g of meat extract), extractant phase volume (6 mL), and the concentration of spiked amines (as described in the experimental section). A factorial design, 2^3 , involving 8 experiments was selected. This model allows evaluating the effects of each variable, as well as the interaction effects between variables. The levels used for each variable were: 35 and 80°C for the maximum temperature, 20 and 150 W for the microwave power, and 0.5 and 4 minutes for the hold time. Higher temperatures were not selected in order not only to avoid losses of the extractant phase by volatilization, but mainly to prevent any HAs formation during heating. Higher powers for the focused microwave were not selected. Higher powers are usually associated to less reproducible results, due to the low irradiation times needed to reach the temperature. Furthermore, the main objective of the work was to decrease the extraction time, and for that reason higher hold times were not studied. The peak area of each amine was selected as the elemental response value of the design. Spiked granulated meat extract samples were employed as described in the experimental section. The experimental design matrix applied is shown in Table 3. The obtained results allowed classifying the amines in two different groups considering their behaviours under the factors considered. One group was formed by the amines Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx, H, and NH, group where some of the most polar amines are included. The second group was formed by the less polar amines Trp-P-2, PhIP, Trp-P-1, A α C, and MeA α C. The amines H and PhIP were chosen as representative examples of each group.

Table 3. Experimental design matrix

Run	Temperature	Hold time	Microwave power
1	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)
3	(-)	(+)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(-)	(-)
6	(-)	(+)	(-)
7	(-)	(-)	(+)
8	(+)	(-)	(+)

(+): Maximum value, (-): Minimum value.

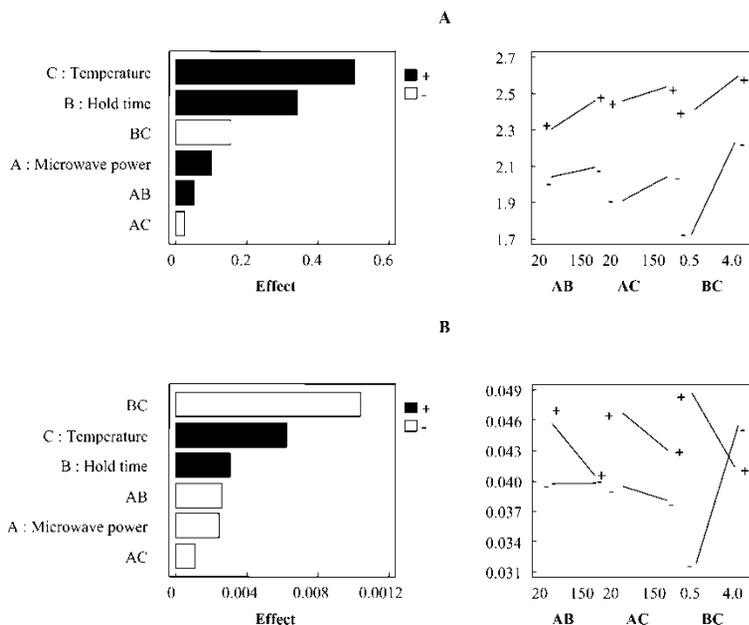


Figure 2. Pareto chart (left) and interaction effect plot (right) for the amines H (A) and PhIP (B) with the factorial design.

Figure 2(A) shows the Pareto Chart, which evaluate main effects and interaction,^[34] obtained by analyzing the experimental results for the representative amines. In this kind of chart, bar lengths are proportional to the absolute value of the estimated effects, helping to compare the relative importance of the effects. It can be observed for less polar amines that temperature and hold time have a positive effect in the response, whereas the microwave power has a negative effect. On the other hand, all the factors have a positive effect for the first group of amines. Figure 2(B) shows the interactions among the factors. An interaction can be observed between the hold time and the temperature for both groups, being the most important factor for the less polar amines. For the less polar amines, the maximum is reached with the lowest level for the hold time and the highest level for the temperature. The maximum is also reached with the highest level for the temperature in the case of polar amines. Considering these results, the selected optimum temperature was 80°C, that is, the highest temperature value.

A series of experiments were carried out in order to study the effect of the interaction between the microwave power and the hold time, as well as to find the optimal values for these variables, focusing our attention in the less polar amines. The less polar amines usually present lower extraction efficiencies due to coeluting interferences.^[11] Three different low values for the hold times were studied: 0.5, 1 and 1.5 min. This decision was made considering not only their

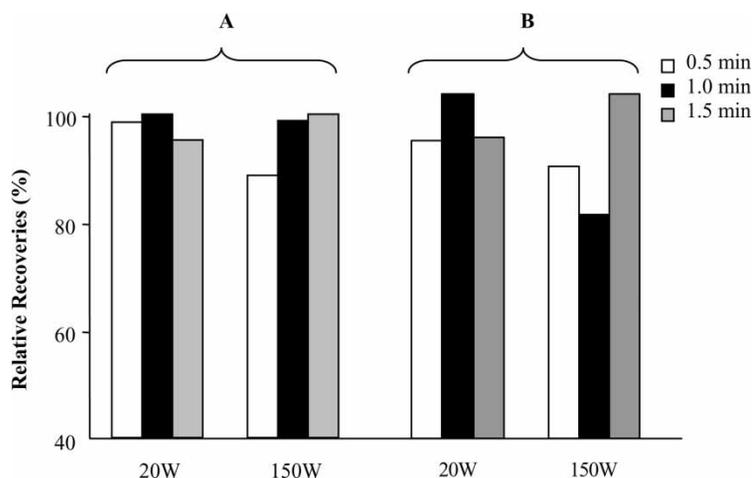


Figure 3. Extraction efficiencies for (A) Trp-P-1 and (B) PhIP at different hold times (0.5, 1 and 1.5 min) and powers (20 and 150 W), keeping constant the maximum temperature at 80°C.

negative effect in all the studied amines, but also in order to decrease the extraction time needed in the process. Two different powers were tested too: 20 and 150 W, keeping constant the already optimized temperature: 80°C. The obtained results can be observed in Figure 3, with the amine Trp-P-1 and PhIP as examples of less polar amines. A low influence of the hold time at low levels of the microwave power can be observed. It can also be seen that there is a slight increase in the response when increasing the hold time at high levels of the microwave power. This slight improvement can be attributed to the low irradiation times needed to reach the maximum temperature with high microwave powers and, hence, an extra radiation time (hold time) is quite useful. With respect to these results, the selected hold time was 1 minute and the selected microwave power was 20 W, in order to increase the effective microwaves action time and therefore to increase the extraction efficiency. Under these conditions, the total extraction time by microwaves was, approximately, five minutes. The short microwaves extraction times required with the proposed method should be highlighted.

Quality Parameters of the Analytical Method

The figures of merit were studied to evaluate the performance of the proposed procedure. Table 4 illustrates the slope, standard deviation of the regression, linearity of the calibration plots, intermediate precision, and detection limits of the optimized method for the studied HAs. All amines showed good linearity with correlation coefficients (R) ranging from 0.996 to 0.999. The studied working ranges were 6–16 ng (injected) for H, Trp-P-2 and Trp-P-1;

Table 4. Quality parameters of the analytical method

Amine	Slope \pm SD ^a	Syx ^b	R	RSD ^c (%)	LOD (ng injected)
Glu-P-2	1948719.0 \pm 48580.8	68632.2	0.998	7.4	1.98
IQ	2108842.8 \pm 53472.4	62248.8	0.998	10.4	1.66
MeIQ	2161759.8 \pm 34544.4	44388.0	0.999	6.9	1.15
MeIQx	1241836.7 \pm 22312.0	18321.7	0.999	12.8	0.83
NH	496931.3 \pm 25527.5	23687.8	0.996	10.4	2.68
H	2305158.0 \pm 115999.3	46475.6	0.997	8.2	1.13
Trp-P-2	1740330.1 \pm 40979.5	12841.2	0.999	12.5	0.41
Trp-P-1	896053.3 \pm 5989.7	2480.6	0.999	7.7	0.16
PhIP	1130134.6 \pm 33915.9	19799.0	0.999	6.1	0.98
A α C	66079.8 \pm 23570.5	1904.4	0.996	12.7	1.62
MeA α C	72882.3 \pm 2311.7	2778.6	0.997	8.4	2.14

^aStandard deviation for n = 9.

^bStandard deviation of the regression.

^cIntermediate precision.

12–30 ng for PhIP; and 16–50 ng for the rest of HAs. Intermediate precision was evaluated by analyzing an intermediate standard by quadruplicate during three non-consecutive days under the optimized conditions. The obtained RSD ranged between 6.1 and 12.8%, showing the repeatability of the proposed method.

Detection limits (LODs) were calculated as described by Cuadros et al.^[35] They oscillated between 0.16 ng (injected) for Trp-P-1 and 2.68 ng for NH. These LODs are slightly better than those reported by Galcerán et al. when using HPLC-ECD,^[31] which oscillated between 0.19 and 3.31 ng (injected). Bermudo et al.^[11] have obtained better results using SPE-HPLC-ECD with two chromatographic runs, with values varying between 0.01 and 0.08 ng.

Analysis of Meat Extracts

Five different kinds of meat extracts were analyzed: granulated meat extract, non-granulated meat extract, chicken extract, and two different brands of meat soup cubes (A and B). The evaluation of the extraction efficiency was carried out in the optimized conditions with 3 spiked portions of meat extracts, as described in the experimental section. The obtained recoveries can be seen in Table 5. They oscillated between 36.0% for PhIP in the soup cube A and 109.5% for Trp-P-1 in the non-granulated meat extract, being the average extraction efficiency of 69.7% for all HAs in all the studied meat extracts. The average recoveries for all HAs in each meat extract sample were 81.2% for the granulated meat extract, 76.4% for the non-granulated extract, 66.7% for the chicken

Table 5. Extraction efficiencies obtained with some commercial meat extracts

Amine	Recovery (%) \pm SD ^a					
	Granulated	Non-granulated	Chicken	Soup cubes A	Soup cubes B	
Glu-P-2	77.6 \pm 9.0	–	64.1 \pm 4.1	–	–	–
IQ	77.2 \pm 4.4	58.1 \pm 6.5	72.5 \pm 1.3	71.7 \pm 1.7	63.8 \pm 1.6	–
MeIQ	83.3 \pm 12.7	81.9 \pm 14.5	67.2 \pm 1.3	57.9 \pm 1.0	59.3 \pm 1.5	–
MeIQx	101.3 \pm 3.8	96.3 \pm 4.4	86.2 \pm 2.1	75.3 \pm 1.4	73.2 \pm 2.7	–
NH	85.1 \pm 12.1	100.0 \pm 2.3	81.0 \pm 19.6	70.2 \pm 2.0	65.4 \pm 7.4	–
H	92.2 \pm 12.6	62.8 \pm 7.8	60.9 \pm 18.6	47.6 \pm 3.5	53.0 \pm 3.2	–
Trp-P-2	57.5 \pm 2.1	50.8 \pm 6.7	–	–	–	–
Trp-P-1	71.7 \pm 2.8	109.5 \pm 8.8	71.3 \pm 17.0	70.7 \pm 12.4	93.7 \pm 2.9	–
PhIP	77.3 \pm 3.1	60.3 \pm 7.3	55.4 \pm 4.3	36.0 \pm 5.0	52.0 \pm 4.4	–
A α C	92.9 \pm 2.6	80.4 \pm 12.6	65.0 \pm 3.3	53.0 \pm 3.7	49.9 \pm 6.1	–
MeA α C	76.9 \pm 2.6	63.3 \pm 8.1	43.5 \pm 3.5	–	–	–
Average	81.2	76.4	66.7	60.3	63.8	–

^aStandard deviation for n = 3.

extract, 60.3% for the soup cubes A, and 63.8% for the soup cubes B. In some cases, Glu-P-2 could not be appropriately quantified in the non-granulated meat extract, and in the soup cubes A and B, because of the presence of some impurities at its retention time. The same situation happens with Trp-P-2 in the soup cubes A and B, as well as in the chicken extract. Similar identification problems took place with MeA α C in the soup cubes A and B. Good recoveries higher than 51% were obtained for all HAs in the granulated and non-granulated meat extracts, and also with the chicken extract, with the exception of MeA α C in this last case. Lower recoveries were obtained with soup cubes A and B, ranging from 47.6 to 93.7%, with the exception of PhIP in the soup cube A. These differences reveal the high dependence of the extraction process with the nature of the matrix, especially for the less polar amines. It should be noted that the optimization of the method was carried out with the granulated meat extract. Hence, this sample generated the best extraction efficiencies under the optimized conditions. Some improvements in the extraction process with other kinds of samples, especially with soup cubes A and B, would be necessary if a higher sensitivity is required.

Finally, it should be also noted that the high recoveries obtained with PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, and A α C, amines, which usually interfere lead to problematic quantification.

CONCLUSIONS

The use of a microwave-assisted extraction procedure has been shown to be a valid alternative in sample preparation for the determination of heterocyclic amines in meat extracts prior to HPLC with electrochemical detection. The short extraction times achieved (five minutes), and the obtaining of both polar and less polar amines in the same chromatographic run, improve the analysis time usually required in methods commonly applied for the determination of these amines in food samples. The proposed method allows the determination of heterocyclic amines in different kinds of meat extracts, with average recoveries between 60.3 and 81.2%, and with limits of detection ranging from 0.16 to 2.68 ng. Furthermore, the method could also be adapted to carry out screening studies of heterocyclic amines in unknown samples.

ACKNOWLEDGMENTS

A. Martín-Calero would like to thank Caja Canarias for a predoctoral fellowship. V. Pino would like to acknowledge the Ministerio de Educación y Ciencia for the Juan de la Cierva contract with University of La Laguna. This work was supported by the projects AGL-2002-02149 financed by Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain), and PI2003/149 financed by Gobierno Autónomo de Canarias (Spain).

REFERENCES

1. Sugimura, T. Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat. Res.* **1997**, *376*, 211–219.
2. País, P.; Knize, M.G. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J. Chromatogr. B* **2000**, *747*, 139–169.
3. Murkovic, M. Eur. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic aromatic amines in fried products. *J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 777–785.
4. Nagao, M.; Ushijima, T.; Watanabe, N.; Okochi, E.; Ochiai, M.; Nagakama, H.; Sugimura, T. Studies on mammary carcinogenesis induced by a heterocyclic amine, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, in mice and rats. *Environ. Mol. Mutagen.* **2002**, *39*, 158–164.
5. Ohgaki, H.; Adamson, R.H.; Synderwine, E.G.; Nagakama, H.; Shirai, T.; Katsumi, I.; Ito, N. In *Food Borne Carcinogens – Heterocyclic Amines*; Nagao, M., Sugimura, T., Eds.; Wiley: Chichester, 2000; 198.
6. IARC. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; Nr.56, 1993, 163.
7. Sugimura, T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 387–395.
8. Sinha, R.; Rothman, N. Role of well done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letts.* **1999**, *143*, 189–194.
9. Skog, K. Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1197–1203.
10. Karamanos, N.K.; Tsegenidis, T. Analysis of carcinogenic heterocyclic amines by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* **1996**, *19*, 2247–2256.
11. Bermudo, E.; Ruiz-Calero, V.; Puignou, L.; Galcerán, M.T. Analysis of heterocyclic amines in chicken by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *536*, 83–90.
12. Ristic, A.; Cichna, M.; Sontag, G. Determination of less polar heterocyclic aromatic amines in standardised beef extracts and cooked meat consumed in Austria by liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **2004**, *802*, 87–94.
13. Barceló-Barrachina, E.; Moyano, E.; Galcerán, M.T.; Libreria, J.L.; Bagó, B.; Cortes, M.A. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. A* **2006**, in press. D.O.I. 10.1016/j.chroma.2006.05.060.
14. Casal, S.; Mendes, E.; Fernández, J.O.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, M.A. Analysis of heterocyclic amines in foods by gas chromatography-mass spectrometry as their *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1040*, 105–114.
15. Sentellas, S.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galcerán, M.T. Optimization of a cleanup procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 193–201.
16. Dragsted, L.D.; Nielsen, S.E.; Heitmann, B.L.; Grivas, S.; Frandsen, H. Immunological methods for dosimetry of heterocyclic amines. *Arch. Toxicol. Suppl.* **1996**, *18*, 259–274.
17. Ruiz-Angel, M.J.; Cardá-Broch, S.; Berthod, A. Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of β -blockers. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1119*, 202–208.
18. Kataoka, H. Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their application in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* **1997**, *774*, 121–142.

19. Galcerán, M.T.; País, P.; Puignou, L. Isolation by solid-phase extraction and liquid chromatographic determination of mutagenic amines in beef extracts. *J. Chromatogr. A* **1996**, *719*, 203–212.
20. Salmon, C.P.; Knize, M.G.; Felton, J.S.; Zhao, B.; Seow, A. Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 484–492.
21. Borgen, E.; Skog, K. Heterocyclic amines in some Swedish cooked foods industrially prepared or from fast food outlets and restaurants. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 292–298.
22. Abdulkarim, B.G.; Smith, J.S. Heterocyclic amines in fresh and processed meat products. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4680–4687.
23. Reistad, R.; Rosslund, O.J.; Latva-Kala, K.J.; Rasmussen, T.; Vikse, R.; Becher, G.; Alexander, J. Heterocyclic aromatic amines in human urine following a fried meat meal. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 945–955.
24. Gu, Y.S.; Kim, I.S.; Ahn, J.K.; Park, D.C.; Yeum, D.M.; Ji, C.I.; Kim, S.B. Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2002**, *515*, 189–195.
25. Toribio, F.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galcerán, M.T. Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract. *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 101–112.
26. Cárdenes, L.; Ayala, J.H.; Afonso, A.M.; González, V. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1030*, 87–93.
27. Cárdenes, L.; Martín-Calero, A.; Ayala, J.H.; González, V.; Afonso, A.M. Experimental design optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of heterocyclic aromatic amines by high performance liquid chromatography. *Anal. Letts.* **2006**, *39*, 405–423.
28. Martín-Calero, A.; Ayala, J.H.; González, V.; Afonso, A.M. Determination of less polar heterocyclic amines in meat extracts. Fast sample preparation method using solid-phase microextraction prior to high-pressure liquid chromatography-fluorescence quantification. *Anal. Chim. Acta.* In press.
29. Pino, V.; Ayala, J.H.; Afonso, A.M.; González, V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments by high performance liquid chromatography after microwave-assisted extraction with micellar media. *J. Chromatogr. A* **2000**, *869*, 515–522.
30. Pensado, L.; Casais, C.; Mejuto, C.; Cela, R. Optimization of the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from wood samples by the use of microwave energy. *J. Chromatogr. A* **2000**, *869*, 505–513.
31. Galcerán, M.T.; País, P.; Puignou, L. High performance liquid-chromatographic determination of 10 heterocyclic aromatic-aminos with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **1993**, *655*, 101–110.
32. Toribio, F.; Puignou, L.; Galcerán, M.T. Evaluation of different cleanup procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract. *J. Chromatogr. A* **1999**, *836*, 223–233.
33. Nobrega, J.A.; Trevizan, L.C.; Araujo, G.C.L.; Nogueira, A.R.A. Focused-microwave assisted strategies for sample preparation. *Spectrochim. Acta Part B—Atomic Spectroscopy* **2002**, *57*, 1855–1876.
34. Montgomery, C. *Design and Analysis of Experiments*, 3rd Ed.; John Wiley & Sons: New York, 1991; Chapter 11.

35. Cuadros-Rodríguez, L.; García-Campaña, A.M.; Jiménez-Linares, C.; Román-Ceba, M. Estimation of performance-characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Anal. Letts.* **1993**, *26*, 1243–1258.

Received August 22, 2006

Accepted September 30, 2006

Manuscript 6928

Aurora Martín-Calero
Gracian Tejral
Juan H. Ayala
Venerando González
Ana M. Afonso

Department of Analytical
Chemistry, Nutrition and Food
Science, University of La Laguna,
La Laguna, Spain

Received September 16, 2009
Revised October 30, 2009
Accepted November 8, 2009

Research Article

Suitability of ionic liquids as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV detection for the determination of heterocyclic aromatic amines

The effects of several ionic liquids (ILs) as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV–Vis detection for the determination of six heterocyclic aromatic amines were evaluated using two different C₁₈ stationary phases with moderate silanol activity. The studied ILs were 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate. The optical behaviour of heterocyclic aromatic amines in presence of ILs was studied and the silanol-suppressing potency of ILs was evaluated for the two stationary phases studied. Several chromatographic parameters were evaluated in the presence or absence of ILs, or using triethylamine, the most common mobile-phase additive. The best results were achieved using 1 mM 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate as mobile-phase additive and NovaPak[®] column. In these conditions and with 18% of ACN in the mobile phase, analytical performance of the chromatographic methods using fluorescence and UV–Vis were evaluated, obtaining good precision in all cases (RSD lower than 6.6%) and low LOD (0.001–0.147 µg/mL with UV–Vis and 0.001–0.006 ng/mL with fluorescence detection).

Keywords: Fluorescence detection / Heterocyclic aromatic amines / Ionic liquids / Mobile-phase additive / UV–Vis detection
DOI 10.1002/jssc.200900596

1 Introduction

Heterocyclic aromatic amines (HAs) form one class of substances with strong mutagenic activity and carcinogenic potential [1]. They are formed naturally in proteinaceous foodstuffs when exposed to heat during the cooking process at common household cooking temperatures [2–4] in a Maillard-type reaction involving amino acids, sugar, creatinine or creatine [5, 6]. Up to now, more than 20 HAs have been identified in cooked foods. Therefore, it is important

to develop sensitive and selective analytical methods to determine these compounds at trace levels.

The main problem for the HPLC determination of HAs is related to their basicity. When these amines are injected in a HPLC system they interact with the residual silanols on the surface of the stationary phase if no additives are added to the mobile phase. The most popular silanol suppressing agent for the separation of HAs is the triethylamine (TEA) [7–10] but its presence can cause slow equilibration of the chromatographic systems when a gradient program is used [11]. Recently, ionic liquids (ILs) have been proposed as possible silanol suppressing agents [12–14]. ILs are salts with low melting points, composed entirely by large organic cations and organic or inorganic anions [15]. ILs have some characteristic physicochemical properties: almost negligible vapour pressure and non-flammability [16]. Because of these properties, it is not surprising that ILs have shown many applications in chemical analysis, being quite common their use as environmentally friendly solvents [17–21].

It has already been proved that ILs can be used as mobile-phase additives in HPLC [11]. Addition of ILs in the mobile phase resulted in decreased peak tailing, reduced band broadening, and improved resolution [22–25]. These changes were partly attributed to the competition between imidazolium cations and the polar groups of the analyte for the silanol group of the alkyl silica surface along with the

Correspondence: Professor Ana M. Afonso, Avda. Astrofísico Fco. Sanchez s/n, Facultad de Química La Laguna, Tenerife 38205, Spain
E-mail: aafonso@ull.es
Fax: +34-922318090

Abbreviations: **AαC**, 2-amino-9H-pyrido[2,3-*b*]indole; **BMIm-BF₄**, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate; **C_{IL}**, ILs concentration; **FE**, fluorescence enhancements; **H**, 1-methyl-9H-pyrido[4,3-*b*]indole; **HAs**, heterocyclic aromatic amines; **HMIm-BF₄**, 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate; **IL**, ionic liquid; **MeAαC**, 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-*b*]indole; **MOIm-BF₄**, 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate; **NH**, 9H-pyrido[4,3-*b*]indole; **TEA**, triethylamine; **Trp-P-1**, 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole; **Trp-P-2**, 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole

formation of a weak bilayer electronic structure on the C₁₈ column [26]. In this sense, ILs have been compared with TEA as mobile-phase additives. He *et al.* [27] and Ruiz-Angel *et al.* [28] demonstrated that ILs, and specially alkylimidazolium-based ILs, were superior to TEA to suppress the effects of residual silanols in C₁₈ stationary phases.

Up to now, most reported applications of ILs as mobile-phase additives in HPLC have been related to UV or diode array detection [11, 29]. A previous study of our group studied for first-time the effect of three ILs as mobile-phase additives in HPLC with electrochemical detection for the determination of HAs [30]. Few reports have been related to fluorescence detection and ILs used as mobile-phase additives because some authors have demonstrated that some ILs, especially alkylimidazolium-based ILs, were not transparent at common working wavelengths [31, 32].

The main aim of this study was to study the effects of three alkylimidazolium-based ILs (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIm-BF₄), 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (HMIm-BF₄) and 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate (MOIm-BF₄)) as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV detection for the determination of six HAs. These HAs were selected because they can be detected in HPLC for absorption or fluorescence. For first-time, the optical behaviour of these HAs in presence of ILs was studied. These studies allowed us to select the optimal wavelengths to carry out the fluorescence and UV detections. Once these wavelengths were fixed, several chromatographic parameters, including evaluation of the silanol-suppressing potency of these ILs, peak-areas, peak-widths, peak-tailings and peak-efficiencies, were evaluated in the presence or absence of ILs in two C₁₈ stationary phases. These results were compared with those obtained when TEA (the most common mobile-phase additive) was used as mobile-phase additive. Finally, a quantitative application was carried out using the best chromatographic conditions and the most adequate IL.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

BMIm-BF₄, HMIm-BF₄ and MOIm-BF₄ ILs were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

The studied compounds were: 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 2-amino-9H-pyrido[2,3-*b*]indole (A α C), purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) and 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA α C), 9H-pyrido[4,3-*b*]indole (NH), 1-methyl-9H-pyrido[4,3-*b*]indole (H) purchased from Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). Stock standard solutions in methanol were prepared containing 92 μ g/mL of H; 520 μ g/mL of NH and 400 μ g/mL of Trp-P-2, Trp-P-1, A α C and MeA α C. These solutions were kept refrigerated at 0°C and protected from

light, and they were used for the preparation of working standard solutions.

All chemicals and solvents used were of HPLC or analytical-reagent grade, and water was purified using Milli-Q gradient A10 (Millipore, UK). All the solvents were filtered through a 0.45 μ m Durapore[®] membrane filter (Millipore) before being used in the chromatographic system.

2.2 Equipment

UV-Vis and fluorescence spectra were obtained on a 8453 diode array spectrophotometer (Hewlett Packard, PA, USA) and a LS 50 spectrofluorimeter (Perkin Elmer, MA, USA), respectively.

The HPLC equipment used was a liquid chromatograph consisting of a solvent delivery ProStar 230 from Varian (PA, USA), equipped with a Rheodyne valve (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a 20 μ L injection loop. A Waters (Milford, MA, USA) 474 scanning fluorescence detector with a resolution of ± 2 nm and a ProStar 325 UV-Vis detector from Varian were used. Data were acquired and evaluated by the Star 5.51 chromatography workstation (Varian). The analytical columns were a Nova-Pak[®] C₁₈ column (4 μ m, 150 mm \times 3.9 mm id) (Waters) and a TSK-Gel ODS-80T_M column (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm id) (Tosoh Biosep, Germany) with a Pelliguard LC-18 guard column (Supelco).

2.3 Fluorescence and UV measurements

UV-Vis and fluorescence spectra were measured in standard quartz cells of 1 cm path length. The excitation and emission slit widths (5 nm) and scan rate (240 nm/min) were maintained constant for all the experiments.

Solutions containing HAs were prepared in different concentrations of ILs of 0, 1, 10 and 15 mM or with 10 mM TEA depending on the experiment. ACN content was fixed at 18% v/v and the pH value was 3.6 in all cases.

2.4 HPLC conditions

Mobile phases were prepared dissolving known amounts of ionic liquid or TEA in deionized water, to get concentrations of 1, 2, 4, 6, 10 and 12 mM in ILs and 10 mM in TEA. The pH value of mobile phases containing ILs was adjusted to 3.6 using either 10% v/v hydrochloric acid or 0.01 M sodium hydroxide. The pH value of mobile phases containing TEA was also adjusted to 3.6 using in this case phosphoric acid (10%). The isocratic mode was performed with 18% v/v ACN at a flow rate of 1.0 mL/min in all the experiments.

The fluorescence detection was performed setting 264 and 410 nm for the excitation and emission wavelengths respectively. The UV detector was set at 263 nm.

3 Results and discussion

3.1 Optical behaviour of HAs in the presence of ILs

The fluorescence spectra of the studied HAs were conducted with amines solutions containing 1 mM of each IL (individually) to select the maximum excitation and emission wavelengths. The pH value was set at 3.6 and the ACN content at 18% v/v in order to reproduce the conditions of the further HPLC separation [30]. The obtained maximum emission (λ_{em}^{max}) and excitation (λ_{ex}^{max}) wavelengths are summarized in Table 1. The HAs did not change their λ_{ex}^{max} and λ_{em}^{max} in the different ILs neither in aqueous medium nor in TEA. However, some differences were observed in the maximum intensities. The fluorescence enhancements (FE) were determined with the three ILs (1 mM) for each amine as the ratio of the relative fluorescence intensity in the presence of the ILs, F_{IL} , to that one obtained in the aqueous medium, F_{H_2O} ($FE = F_{IL}/F_{H_2O}$). As summarized in Table 1, the highest FE values were for NH in the different ILs studied. The rest of HAs presented FE next to 1. All the amines, except MeA α C, presented the highest values of FE in the presence of BMIm-BF₄. For comparative purposes, the FE with this IL in relation to the relative fluorescence intensity in the presence of TEA (1 mM in both cases) were determined ($F_{BMIm-BF_4}/F_{TEA}$). These values are summarized in Table 1. As it can be observed, the FE were next to 1 for all the amines.

The absorption behaviour of the HAs in the presence of ILs was examined using same experimental conditions than with fluorescence detection (pH 3.6 and 18% v/v of ACN). Figure 1A shows the absorption spectra of each IL (1 mM) and Fig. 1B shows the absorption spectra of the HAs in 1 mM BMIm-BF₄. As it can be seen, the absorption spectra of the three ILs solutions are very similar. All the ILs showed an absorbance maximum around 200 nm, but none overlapped with the maxima of absorbance of the studied HAs. Furthermore, an absorption tail which was previously observed with other ILs [31], was also clearly visible in the studied ILs. This tail is located between 240 and 280 nm, as shown in Fig. 1A. With the exception of HMIm-BF₄, these absorption tails were negligible compared with HAs absorbances, as shown in Fig. 1B.

The fluorescence intensity emitted by HAs was studied in the presence of BMIm-BF₄ varying the IL concentration from 1 to 15 mM because this IL provided the highest FE.

Spectra without the addition of BMIm-BF₄ were also obtained for comparative purposes. The results showed that the six studied amines could be classified in three groups with regards to their behaviours. The first group was formed by NH and H. The intensities of these amines increased when the concentration of BMIm-BF₄ increased. This behaviour was especially marked up to 1 mM, but at higher concentrations the intensities practically kept constant. The second group was constituted by Trp-P-2 and Trp-P-1. For these amines the intensities increased when the concentration of IL was increased from 1 to 10 mM, but they remained constant at higher concentrations. The group formed by A α C and MeA α C presented a decrease in their intensities when the concentration of IL increased up to 10 mM, and then they increased at higher concentrations. Figure 2 shows variation of the emission spectra for NH, Trp-P-1 and A α C, as representative examples, when varying the BMIm-BF₄ concentration. The spectra of BMIm-BF₄ at different concentrations have been included for comparative purposes. As shown in Fig. 2, BMIm-BF₄ presented an emission maximum at 430 nm at high IL concentrations. This behaviour interacted with the fluorescence of the HAs and their spectra were affected. This could be the reason why Trp-P-2, Trp-P-1, A α C and MeA α C showed a band at wavelengths higher than 400 nm when dissolved in high concentrations of IL.

Taking all these findings into account, it was considered that the concentration of ILs in the mobile phase was a parameter that had to be considered in HPLC, especially when fluorescence detection was used. In this sense, the results clearly established that the fluorescence due to the studied ILs could not be ignored and in some cases they could increase the fluorescence response of some HAs. This increase in the fluorescence response could conduct to more selective and sensitive chromatographic methods and improvements in LOD.

If it was intended to study the effects of a group of ILs as mobile-phase additives, fixed wavelengths should be chosen to carry out UV–Vis and fluorescence detections later. For the UV detection, a compromising situation was achieved setting 263 nm as fixed wavelength to carry out this detection. For the fluorescence detection, the less fluorescent amines (NH, H and A α C) had to be favoured. It was considered that the best compromising situation for all the compounds was 410 and 264 nm as λ_{em} and λ_{ex} , respectively.

Table 1. Excitation and emission maxima and FE for the different HAs

Compound	λ_{ex}^{max}	λ_{em}^{max}	$F_{BMIm-BF_4}/F_{H_2O}$	$F_{HMIm-BF_4}/F_{H_2O}$	$F_{MOIm-BF_4}/F_{H_2O}$	$F_{BMIm-BF_4}/F_{TEA}$
NH	300	442	3.74	2.11	1.65	0.930
H	299	432	1.26	1.20	0.943	0.957
Trp-P-2	264	410	1.00	0.934	0.967	1.03
Trp-P-1	263	416	1.07	0.975	0.975	1.01
A α C	348	402	0.903	0.872	0.741	1.06
MeA α C	356	410	0.899	1.00	0.986	0.930

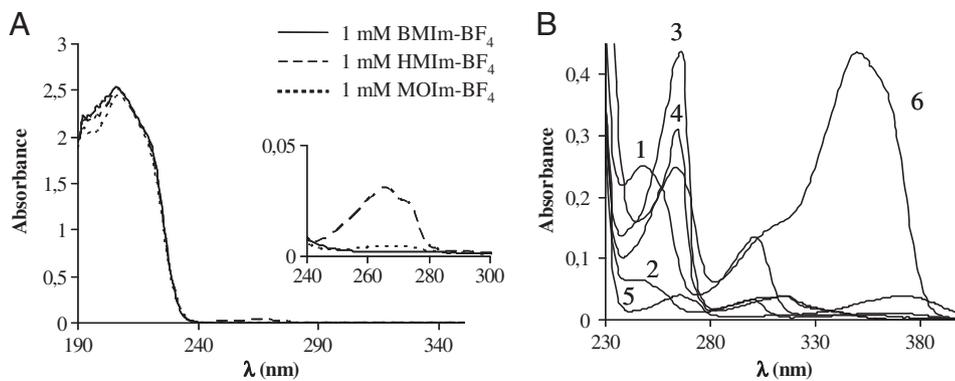


Figure 1. Absorption spectra of ILs (1 mM) (A) and HAs in 1 mM BMIm-BF₄ (B): (1) NH, (2) H, (3) Trp-P-2, (4) Trp-P-1, (5) AαC and (6) MeAαC.

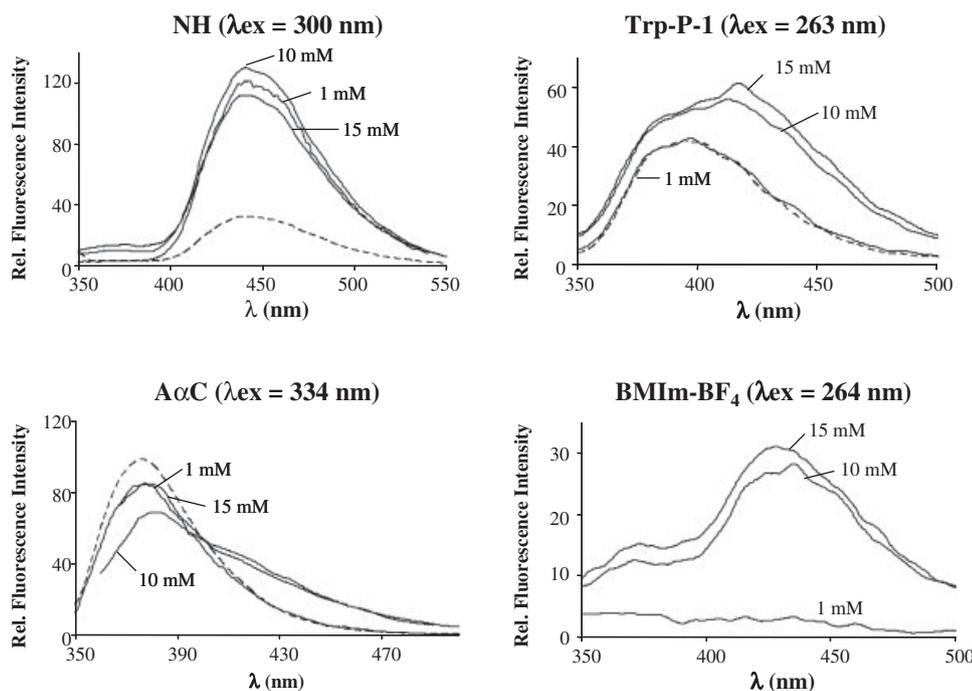


Figure 2. Emission spectra of NH, Trp-P-1 and AαC in absence of additive (dotted lines) and at different concentrations of BMIm-BF₄ (solid lines). Emission spectra of BMIm-BF₄ at different concentrations are included.

3.2 Alkylimidazolium-based ILs as mobile-phase additives in HPLC separation of HAs

3.2.1 Silanol-masking effect of alkylimidazolium-based ILs

It is well known that in the HPLC determination of HAs, the main problem is the probable interaction between these compounds and the residual silanols on the surface of the stationary phase. These undesirable interactions produce peak-tailings or excessive retention times. The solution is to mask silanol groups by the addition of an additive to the mobile phase. In this section, three alkylimidazolium-based ILs were evaluated as silanol-masking agents.

Horváth and co-workers [33, 34] proposed one model to evaluate the silanol-suppressing potency of masking agents:

$$\frac{[A]}{k_0 - k} = \frac{1}{k_2 K_A} + \frac{[A]}{k_2}$$

where k_0 is the retention factor obtained in the absence of additives and k is the retention factor obtained at a certain concentration of masking agent, [A], ILs in our case. k_2 is the silanophilic contribution to the retention mechanism of analytes. K_A is the binding constant between the silanol and the masking agent and shows the ability of the masking agent to block the silanol sites. K_A values are related to the retention times of the analytes: higher K_A values indicate a more stable silanol-masking agent complex and so, lower retention times of the analytes. Plots of $[A]/(k_0 - k)$ versus [A] yielded straight lines from which the silanophilic retention factor (k_2) and the stability of the silanol-masking agent complex (K_A) could be estimated for these ILs in the two stationary phases studied. All the amines showed good linearity with correlation coefficients ranging between 0.966 and 0.999. Figure 3 shows these plots for NH as a representative amine, with the three ILs as mobile-phase additives.

K_A values are listed in Table 2 for the six amines studied and when the three ILs were used as mobile-phase additives. The highest K_A values were found for MOIm-BF₄ for the two stationary phases, except for A α C and MeA α C with the NovaPak[®] column. This IL presented the highest silanol masking effect. Both stationary phases showed the same behaviour for the first four amines. In these cases, the K_A value increased when increasing the length of the alkyl chain in the IL. These results were concordant with those reported by Marszał *et al.* [29] for these ILs using other test analytes and other stationary phase. On the other hand, A α C and MeA α C presented a curious behaviour with the NovaPak[®] column, the highest K_A values were found when HMIIm-BF₄ was used.

The most important conclusion derived from the determination of K_A is to calculate the recommended ILs concentration (C_{IL}). C_{IL} is the IL concentration which reduces the silanol effects by 95% (C_{IL} was taken as $20/K_A$) [34]. These values are expected to serve as a useful guide in the selection of adequate concentrations of ILs. The C_{IL} values obtained for the three ILs studied are listed in Table 2. As it can be seen, C_{IL} ranged between 0.017 and

Table 2. Silanol stability constants (K_A) and the recommended IL concentration

Compound	NovaPak [®]		ODS	
	$K_A \times 10^{-4}$ (M ⁻¹)	C_{IL} (mM)	$K_A \times 10^{-4}$ (M ⁻¹)	C_{IL} (mM)
<i>BMIm-BF₄</i>				
NH	4.95	0.383	6.03	0.315
H	4.83	0.393	6.76	0.281
Trp-P-2	3.93	0.483	4.56	0.417
Trp-P-1	2.70	0.704	3.77	0.503
A α C	3.60	0.528	–	–
MeA α C	2.75	0.691	–	–
<i>HMIIm-BF₄</i>				
NH	10.7	0.177	13.3	0.143
H	10.8	0.176	15.8	0.120
Trp-P-2	7.50	0.253	10.6	0.179
Trp-P-1	6.63	0.286	7.05	0.269
A α C	4.47	0.425	–	–
MeA α C	5.00	0.380	–	–
<i>MOIm-BF₄</i>				
NH	21.1	0.090	19.4	0.097
H	31.8	0.060	30.8	0.062
Trp-P-2	110	0.017	34.3	0.055
Trp-P-1	32.8	0.060	34.0	0.056
A α C	2.80	0.679	–	–
MeA α C	2.01	0.913	–	–

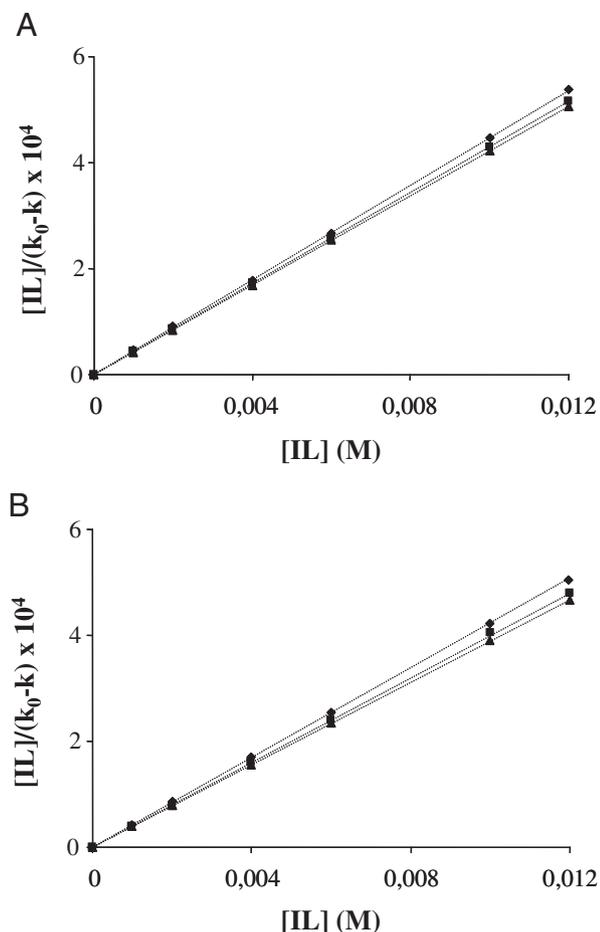


Figure 3. Plots of $[IL]/(k_0 - k)$ versus $[IL]$ for the retention of NH in the NovaPak[®] (A) and ODS (B) stationary phases and the three ILs studied: (◆) BMIm-BF₄, (■) HMIIm-BF₄ and (▲) MOIm-BF₄.

0.913 mM for the two stationary phases. The lowest retention times were obtained when MOIm-BF₄ was used as mobile-phase additive, and consequently, the lowest C_{IL} , as it can be seen in Table 2.

Considering all these findings, the lowest ILs concentration was set at 1 mM to ensure the elimination of the silanol effect by 95% in the two stationary phases. To study the suitability of ILs as mobile-phase additives in the HPLC determination of HAs, the ILs concentration ranged between 1 and 12 mM.

3.2.2 Effect of ILs on the retention time and peak-shape

From the results obtained in the previous section we can conclude that when ILs were added in small amounts to the mobile phase they acted as masking agents and modified the HAs retention times. In general, retention times decreased when ILs concentration increased from 0 to 2 mM in the studied stationary phases. These decreases were stronger with the increase of the alkyl chain in the ILs. At higher concentrations, retention times kept practically constant. Figure 4 shows the chromatograms obtained with fluorescence detection for HAs in the NovaPak[®] stationary phase with the three ILs as mobile-phase additives at different concentrations. Chromatograms obtained with 10 mM TEA and without additive have also been included for comparative purposes.

It is well known that lower retention times produce lower peak-widths. For the HAs studied with ILs as mobile-

phase additives, two different behaviours were found. The peak-widths decreased when ILs concentration increased from 0 to 2 mM for both stationary phases and for all the amines, as shown in Fig. 4. This decrease was especially significant for the amines with the highest retention times, A α C and MeA α C. At higher concentrations, peak-widths kept practically constant.

Peak-tailing is a common problem when HAs are determined by HPLC. ILs not only decreased retention times and peak-widths, but also peak-tailings for all the amines. As shown in Fig. 4, peak-tailings kept practically constant when ILs concentration increased. Higher peak-tailings were obtained when 10 mM TEA was used as mobile-phase additive, which could be clearly observed when compared with those obtained when 10 mM ILs were used as mobile-phase additives.

Compared with TEA, the most common additive, ILs produced important improvements in peak-shapes when they were used as mobile-phase additives. Retention times

and peak-tailings decreased in the presence of the three ILs studied. These improvements contributed to obtain better chromatographic resolutions. Briefly, 1 mM BMIm-BF₄ was found as the best condition with respect to retention times and peak-shapes.

3.2.3 Effect of ILs on the peak-heights and peak-efficiencies

Peak-areas and peak-heights are related to both chromatographic and detection aspects. NH and H presented the same behaviour with respect to peak-heights. The peak-heights of these amines presented the same trend in the two stationary phases for the three ILs when using UV detection: they increased when the alkyl chain increased in the ILs. On the other hand, these amines presented the highest fluorescence enhancement for BMIm-BF₄ (Table 1) and this behaviour produced peak-heights higher than those expected if we only considered the chromatographic aspect.

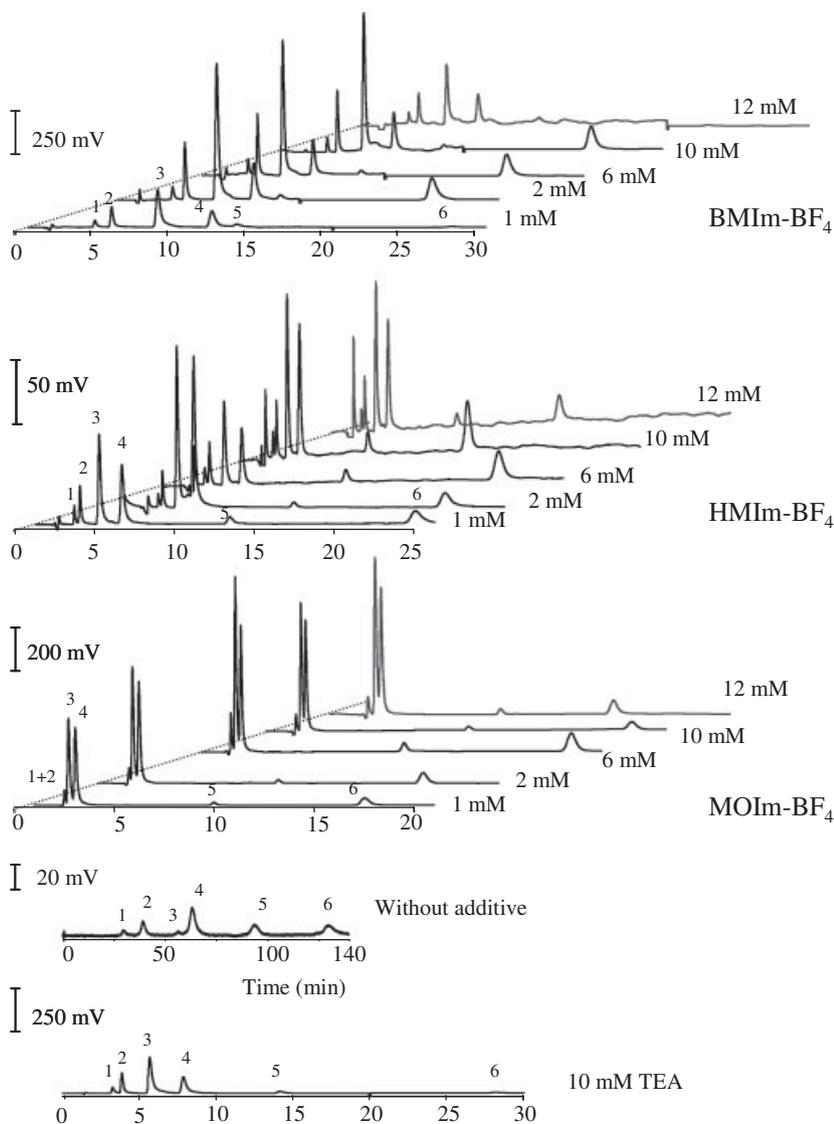


Figure 4. Chromatograms of all amines using different concentrations of BMIm-BF₄, HMIIm-BF₄ and MOIm-BF₄, 10 mM TEA and without additive in the mobile phase in the NovaPak[®] column with fluorescence detection. HAS elution order and concentrations: (1) NH (1.98 ng/mL), (2) H (0.672 ng/mL), (3) Trp-P-2 (0.608 ng/mL), (4) Trp-P-1 (0.640 ng/mL), (5) A α C (3.31 ng/mL), and (6) MeA α C (0.320 ng/mL).

Figure 5 shows peak-heights *versus* ILs concentration for NH in the NovaPak[®] stationary phase.

Trp-P-2 and Trp-P-1 presented the same behaviour described above for NH and H, in general, in the two stationary phases studied. However, peak-heights increased more than it was expected for the NovaPak[®] and ODS columns when BMIm-BF₄ was used as mobile-phase additive and with fluorescence detection. This can be because the working excitation and emission wavelengths were next to the $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ and $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ obtained for Trp-P-2 and Trp-P-1 (Table 1).

Less polar amines, A α C and MeA α C, showed a particular behaviour for the three ILs and both stationary phases. For these amines peak-heights were constant or showed a slight increase at low concentration of IL, with both UV-Vis and fluorescence detection, as shown in Fig. 5.

In general, both in UV-Vis as in fluorescence detection, when ILs concentration increased, peak-heights also increased.

The change in peak efficiency observed on the HAS peaks was expressed as the plate count measured with the mobile-phase additive over the plate count obtained in the same conditions for the same compound without additive (N/N_0). Figure 6 shows the results obtained when 10 mM BMIm-BF₄, HMIm-BF₄, MOIm-BF₄ or TEA were used as mobile-phase additives and with fluorescence detection. For the ODS column and without any mobile-phase additive, A α C and MeA α C presented retention times higher than 220 min and have not been included. In this case, with this stationary phase, BMIm-BF₄ and HMIm-BF₄ provided the highest efficiencies. On the other hand, all the amines,

except A α C, presented a similar behaviour for the NovaPak[®] column: the highest efficiencies were obtained when BMIm-BF₄ was used as mobile-phase additive.

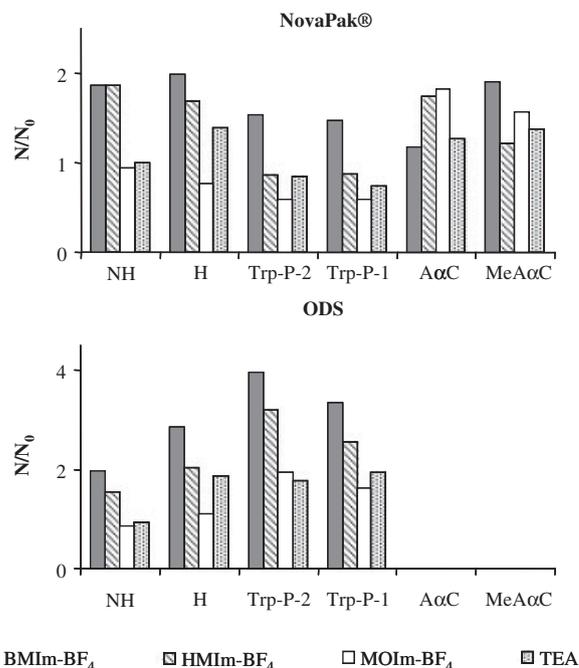


Figure 6. Change in peak efficiency expressed as plate count measured with the mobile-phase additive (10 mM in all cases), N , over the plate count obtained in the same conditions for the same compound without additive, N_0 .

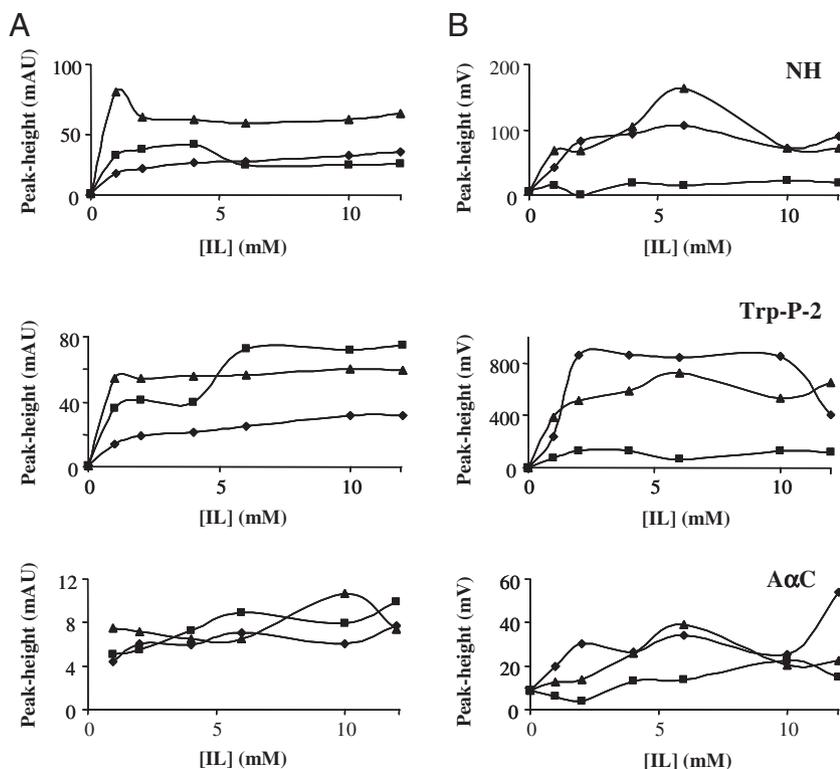


Figure 5. Peak-heights for NH, Trp-P-2 and A α C with the three ILs in the NovaPak[®] stationary phase with UV-Vis (A) and fluorescence (B) detection. ILs: (♦) BMIm-BF₄, (■) HMIm-BF₄ and (▲) MOIm-BF₄.

3.3 Analytical performance of the chromatographic method

In order to demonstrate the usefulness of the use of ILs as mobile-phase additives for the chromatographic determination of HAs, 1 mM BMIm-BF₄ and the NovaPak[®] column were selected as the best conditions. In these conditions and with 18% v/v of ACN in the mobile-phase, calibration curves were carried out with both UV-Vis and fluorescence detection to compare the sensitivities obtained in both cases. Table 3 lists the quality parameters of the chromatographic methods. As it was mentioned before, when ILs were used as mobile-phase additives they improved peak-areas, baseline and decreased retention times and peak-tailings among other aspects. These improvements allowed us to use dynamic ranges between 0.0025 and 0.932 µg/mL with UV-Vis detection and between 0.0017 and 0.289 ng/mL with fluorescence detection. These dynamic ranges, with correlation coefficients higher than 0.993 in all cases, were comparable to those used by other authors [35, 36], even when a more selective detector (MS) was used.

As summarized in Table 3, slopes obtained with fluorescence detection were at least ten times higher than those obtained with UV-Vis. For Trp-P-2, the slope obtained with fluorescence detection was 35 times higher than the slope obtained with UV-Vis detection.

To evaluate the reproducibility of the chromatographic method, five standard solutions with the concentrations pointed out in Table 3 were analysed over three consecutive days. The obtained RSD ranged from 3.2 to 6.6% in UV-Vis detection and from 0.65 to 5.2% in fluorescence detection. It must be highlighted that the RSD obtained with fluores-

cence detection were comparable to those obtained with UV-Vis although the studied concentration levels were 10³ times lower.

The best improvement attained in the chromatographic method when ILs were used as mobile-phase additives was found in the LODs. LODs were calculated as three times the signal-to-noise ratio. LODs ranged between 0.001 µg/mL for H and 0.147 µg/mL for Trp-P-1 with the UV-Vis detection and between 0.001 ng/mL for NH and 0.006 ng/mL for AαC when fluorescence detection was used.

It must be highlighted that these LODs were comparable or inferior to those obtained by other authors using more complicated methodologies as SPME-HPLC-FD (0.3–75 ng/L) [37], hollow-fibre supported liquid membrane-HPLC-UV (0.1–0.5 µg/L) [38] or SPE-HPLC-MS (1.8–7.4 ng/L) [35].

The use of BMIm-BF₄ as mobile-phase additives in HPLC in conjunction with a sensitive detection technique such as fluorescence would allow us to reach nanogram per gram levels, needed for the determination of HAs in food samples without preconcentration steps.

It should be commented here that no obvious decrease in the columns performance was observed by the utilization of ILs as mobile-phase additives, at least not during the period of time when this study was conducted. Moreover, ILs have also been used as mobile-phase additives with these same stationary phases in some other works of our group [30, 37].

4 Concluding remarks

The beneficial effects of three ILs as mobile-phase additives in HPLC with fluorescence and UV-Vis detection for the

Table 3. Quality parameters of the analytical method with UV-Vis and fluorescence detection

<i>UV-Vis detection</i>				
Compound	Dynamic range (µg/mL)	(Slope ± SD) × 10 ⁻⁶	RSD (%) ^{a)}	LOD (µg/mL)
NH	0.038–0.966	0.98 ± 0.07	3.80 (0.097)	0.031
H	0.0025–0.368	2.78 ± 0.04	4.54 (0.033)	0.001
Trp-P-2	0.026–0.295	9.1 ± 0.4	3.98 (0.029)	0.024
Trp-P-1	0.148–0.932	6.2 ± 0.4	6.34 (0.093)	0.147
AαC	0.157–0.920	0.12 ± 0.01	6.60 (0.092)	0.024
MeAαC	0.019–0.389	4.3 ± 0.3	3.19 (0.039)	0.009
<i>Fluorescence detection</i>				
Compound	Dynamic range (ng/mL)	(Slope ± SD) × 10 ⁻⁷	RSD (%) ^{a)}	LOD (ng/mL)
NH	0.0028–0.289	0.63 ± 0.06	2.64 (0.362)	0.001
H	0.004–0.098	6.6 ± 0.4	2.27 (0.122)	0.003
Trp-P-2	0.0017–0.044	31 ± 10	2.56 (0.111)	0.001
Trp-P-1	0.0034–0.093	19 ± 6	3.17 (0.349)	0.003
AαC	0.018–0.276	0.16 ± 0.03	5.20 (0.345)	0.006
MeAαC	0.0021–0.117	4.7 ± 0.5	0.65 (0.146)	0.002

a) Run-to-run (*n* = 5) samples analyzed. Values in parenthesis are the concentration values used (µg/mL and ng/mL with UV-Vis and fluorescence detection, respectively).

determination of a group of HAs were studied using two different C₁₈ stationary phases with moderate silanol activity. For first-time, the fluorescence behaviour of HAs in the presence of ILs was studied and an increase in the emitted fluorescence was observed for some amines. This increase in the fluorescence response could lead to more selective and sensitive chromatographic methods and improvements in LOD.

The silanol-suppressing potency of ILs was evaluated and the highest silanol masking effect was found for MOIm-BF₄. The ILs were found to be more favorable than the common additive, TEA, as mobile-phase additive. 1 mM BMIm-BF₄ was selected as the best additive in order to obtain the best conditions with respect to retention times, peak-tailings and peak-efficiencies. Moreover, the highest peak-areas were found when BMIm-BF₄ was used as mobile-phase additive with fluorescence detection. In these conditions the LODs ranged between 1 and 6 pg/mL. The optimized method could be adequate for the determination of HAs at trace levels in different types of sample.

A. M. A. acknowledges funding from the Spanish Ministry of Innovation and Science (MICINN) project ref. CTQ2008-06253/BQU. This study was also supported by the projects ULL APD-08/01 and SolSubC200801000171 from the Canary Agency for Research and Innovation (ACISII). A. M.-C. thanks the Consejería de Industria del Gobierno de Canarias for her contract, reference ID-TF-07/074.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Sanz Alaejos, M., Pino, V., Afonso, A. M., *Food Res. Int.* 2008, 41, 327–340.
- [2] Sugimura, T., *Mutat. Res.* 1997, 376, 211–219.
- [3] País, P., Knize, M. G., *J. Chromatogr. B* 2000, 747, 139–169.
- [4] Murkovic, M., *J. Lipid Sci. Technol.* 2004, 106, 777–785.
- [5] Van Dyck, M. M. C., Rollmann, B., De Meester, C., Layton, D. W., *J. Chromatogr. A* 1995, 697, 377–382.
- [6] Schwarzenbach, R., Gubler, D., *J. Chromatogr.* 1992, 624, 491–495.
- [7] Toribio, F., Puignou, L., Galcerán, M. T., *J. Chromatogr. A* 1999, 836, 223–233.
- [8] Cárdenas, L., Ayala, J. H., Afonso, A. M., González, V., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 87–93.
- [9] Martín-Calero, A., Ayala, J. H., González, V., Afonso, A. M., *Anal. Chim. Acta* 2007, 582, 259–266.
- [10] Janoszka, B., Błaszczak, U., Damasiewicz-Bodzek, A., Sajewicz, M., *Food Chem.* 2009, 113, 1188–1196.
- [11] Polyakova, Y., Koo, Y. M., Row, K. H., *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2006, 11, 1–6.
- [12] Zhang, W., He, L., Yanglong, G., Liu, X., Jiang, S., *Anal. Lett.* 2003, 827, 827–838.
- [13] He, L., Zhang, W., Zhao, L., Liu, X., Jiang, S., *J. Chromatogr. A* 2003, 1007, 39–45.
- [14] Xiaohua, X., Liang, Z., Xia, L., Shengxiang, J., *Anal. Chim. Acta* 2004, 519, 207–211.
- [15] Shamsi, S. A., Danielson, N. D., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1729–1750.
- [16] Poole, C. F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 49–82.
- [17] Carda-Broch, S., Berthod, A., Armstrong, D. W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 375, 191–199.
- [18] Liu, J. F., Jönson, J. A., Jiang, G. B., *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 20–26.
- [19] Han, X., Armstrong, D. W., *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 1079–1086.
- [20] Baker, G. A., Baker, S. N., Pandley, S., Bright, F. V., *Analyst* 2005, 130, 800–808.
- [21] Liu, J. F., Jiang, G. B., Liu, J. M., Jönson, J. A., Wen, M. J., *J. Chromatogr. A* 2007, 1184, 6–18.
- [22] Kaliszan, R., Marszał, M. P., Markuszewski, M. J., Bączek, T., Pernak, J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 263–271.
- [23] Marszał, M. P., Bączek, T., Kaliszan, R., *Anal. Chim. Acta* 2005, 547, 172–178.
- [24] Polyakova, Y., Jin, Y., Zheng, J., Row, K. H., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2006, 29, 1687–1701.
- [25] Polyakova, Y., Row, K. H., *Acta Chromatogr.* 2006, 17, 210–221.
- [26] Pandey, S., *Anal. Chim. Acta* 2006, 556, 38–45.
- [27] He, L., Zhang, W., Zhao, L., Liu, X., Jiang, S. X., *Anal. Lett.* 2003, 36, 827–838.
- [28] Ruiz-Angel, M. J., Carda-Broch, S., Berthod, A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1119, 202–208.
- [29] Marszał, M. P., Bączek, T., Kaliszan, R., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 1138–1145.
- [30] Martín-Calero, A., Pino, V., Ayala, J. H., González, V., Afonso, A. M., *Talanta* 2009, 79, 590–597.
- [31] Paul, A., Samanta, A., *J. Chem. Sci.* 2006, 118, 335–340.
- [32] Mandal, P. K., Paul, A., Samanta, A., *J. Photochem. Photobiol A Chem.* 2006, 182, 113–120.
- [33] Nahum, A., Horváth, C., *J. Chromatogr.* 1981, 203, 53–63.
- [34] Bij, K. E., Horváth, C., Melander, W. R., Nahum, A., *J. Chromatogr.* 1981, 203, 65–84.
- [35] País, P., Moyano, E., Puignou, L., Galcerán, M. T., *J. Chromatogr. A* 1997, 778, 207–218.
- [36] Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L., Galcerán, M. T., *J. Chromatogr. A* 2000, 869, 307–317.
- [37] Martín-Calero, A., Ayala, J. H., González, V., Afonso, A. M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 937–946.
- [38] Shah, F. U., Barri, T., Jönsson, J. A., Skog, K., *J. Chromatogr. B* 2008, 870, 203–208.



Ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to the determination of heterocyclic aromatic amines in meat-based infant foods

Aurora Martín-Calero, Verónica Pino, Juan H. Ayala, Venerando González, Ana M. Afonso*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, University of La Laguna, 38205 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 December 2008
Received in revised form 6 April 2009
Accepted 16 April 2009
Available online 3 May 2009

Keywords:

Heterocyclic aromatic amines
Ionic liquids
High-performance liquid chromatography
Electrochemical detection
Meat-based infant foods

ABSTRACT

The beneficial effects of several ionic liquids (ILs) as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography with electrochemical detection for the determination of six heterocyclic aromatic amines (HAs) have been evaluated for first-time. The studied ionic liquids were 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIm-BF₄), 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (HMIm-BF₄) and 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate (MOIm-BF₄). Several chromatographic parameters have been evaluated in the presence or absence of ILs, or using ammonium acetate as the most common mobile phase additive, with three different C18 stationary phases. The effect of the acetonitrile content was also addressed. In general, best resolution, lower peak-widths (up to 72.1% lower) and lower retention factors are obtained when using ILs rather than ammonium acetate as mobile phase additives. The main improvement was obtained in the baseline noise, being 360% less noisy for BMIm-BF₄, 310% for HMIm-BF₄, and 227% for MOIm-BF₄, when compared to ammonium acetate at +1000 mV. Different chromatographic methods using the best conditions for each IL were also evaluated and compared. Finally, the best chromatographic conditions using 1 mM of BMIm-BF₄ as mobile phase additive, the Nova-Pak® C18 column, 19% (v/v) of acetonitrile content in the mobile phase, and +1000 mV in the ECD, have been applied for the chromatographic analysis of six HAs contained in meat-based infant foods. The whole extraction method of meat-based infant foods using focused microwave-assisted extraction and solid-phase extraction has also been optimized. Extraction efficiencies up to 89% and detection limits ranged between 9.30 and 0.165 ng g⁻¹ have been obtained under optimized conditions.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The separation of basic compounds in high-performance liquid chromatography (HPLC) still remains problematic due to the silanol interactions [1,2]. The poor performance seen with basic compounds has been partially addressed through the development and introduction of the so-called base-deactivated materials [3,4]. Nevertheless, addition of alkylamines and other amino quenchers to the mobile phase does not fully remove the deleterious effect of free silanols on the retention of basic analytes, even when employing the purified and least acidic silica supports [5].

A new alternative to reduce or suppress the silanol activity is based on the utilization of ionic liquids (ILs) as additives of the mobile phase [6–13]. ILs are a class of low melting point ionic compounds which have a variety of properties allowing many of them to be sustainable green solvents. ILs possess high thermal

stabilities and negligible vapor pressures making them attractive alternatives to environmentally unfriendly solvents that produce volatile organic compounds [14]. They have been used in a number of analytical applications, including some extraction processes [15–19].

ILs evidently lose many of their original properties when they are diluted to act as eluent additives. In some cases, they may keep several of their intermolecular interactions, which may be useful for chromatographic separations [9]. The beneficial effects of ILs in the separation of basic compounds have been described as it follows: ILs cations could interact and compete for the silanol groups with the basic groups of the analytes. In addition, the nonpolar alkyl groups of the stationary phase can interact with different alkyl groups of the heterocyclic ring or quaternary cation of the IL [6]. At the same time, the chaotropic character of the anions constituting ionic liquids is responsible for possible ion-pairing with cationic solutes [10]. All these interactions could efficiently shield the residual silanols and improve the peak shapes while reducing the chromatographic retention times of the basic analytes [9].

* Corresponding author. Fax: +34 922318090.
E-mail address: aafonso@ull.es (A.M. Afonso).

All the reported applications of ILs as mobile phase additives include HPLC with UV or diode array detection [6–8,10]. To our knowledge, there are not reported studies using HPLC with electrochemical detection (ECD) and ILs. Electrochemical detection of analytes is based on the electrochemical response of the compounds at the operating potential, and it requires the presence of an ionic mobile phase in order to have an adequate electrolyte solution. Therefore, it results necessary to evaluate the effect of the ionic liquids in such ionic mobile phase.

The main aim of this work was to study for first-time the beneficial effect of a group of alkylimidazolium-based ILs as mobile phase additives in HPLC with ECD in the determination of a group of heterocyclic aromatic amines (HAs). HAs are known for their potent mutagenic response and they have also been linked to cancer [20–22]. These basic compounds are usually determined by HPLC using triethylamine (TEA) [23] or ammonium acetate [24,25] as mobile phase additives. Several specific columns have been developed to analyze these amines [26], and in this way, this study includes the effect of ILs in three different C18 stationary phases (with low and moderate silanol activity). Several chromatographic parameters including resolution, efficiency, peak-width, peak-area, peak-height, and retention factor have been evaluated in the presence or absence of ILs. Furthermore, both the influence of the acetonitrile content and the effect of the ILs on the relationship between the applied potential *versus* the obtained intensity of the ECD, have been treated. Finally, an application of the method using the best chromatographic conditions and the most adequate IL (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, BMIm-BF₄) has been conducted in meat-based infant foods to determine six HAs. The overall extraction process using focused microwave-assisted extraction and solid-phase extraction in combination with HPLC–ECD has also been optimized. ILs are also proposed for first time as eluting agents in SPE.

2. Experimental

2.1. Reagents

The studied amines were: 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1), and 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole (A α C), purchased from Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada); 2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole (MeA α C), 9H-pyrido[4,3-b]indole (NH), and 1-methyl-9H-pyrido[4,3-b]indole (H), purchased from Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). Stock standard solutions in methanol were prepared containing 92 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of H; 520 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of NH; 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of Trp-P-2, Trp-P-1, A α C and MeA α C. These solutions were kept refrigerated at 0 °C and protected from light, and they were used for the preparation of working standard solutions.

The studied ionic liquids were: 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIm-BF₄), 1-methyl-3-octylimidazolium tetrafluoroborate (MOIm-BF₄), and 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (HMIm-BF₄), purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ammonium acetate and potassium chloride, were of pro-analysis grade quality and supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Acetonitrile and methanol were of HPLC-grade supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) and Merck, respectively. Water was purified using a Milli-Q gradient A10 system from Millipore (Billerica, MA, USA). All solvents were filtered through a 0.45 μm Durapore® membrane filter (Millipore) before being used in the chromatographic system.

2.2. Instrumentation

Focused microwave-assisted extractions were performed at atmospheric pressure using the Discover model of the CEM Focused Microwave™ Synthesis System (Matthews, NC, USA) equipped with an infrared temperature control system, stirring and cooling options. The ChemDriver™ software (CEM) was used for data acquisition.

C18 cartridges (100 mg) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The cartridges were conditioned using 5 mL of methanol, followed by 5 mL of water and then 500 μL of ammonium acetate. Elution was accelerated with a Visiprep™ solid-phase extraction vacuum manifold from Supelco.

The HPLC system was a liquid chromatograph consisting of a solvent delivery system ProStar 230 from Varian (Palo Alto, CA, USA) equipped with a Rheodyne valve (Supelco) with a 20 μL injection loop. The detection of HAs was carried out using a ProStar 370 Electrochemical Detector (Varian). It was provided with a working electrode (glassy carbon), a reference electrode (Ag/AgCl, 2 M) and an auxiliary electrode (stainless steel). Three analytical columns were used: a TSK Gel® ODS-80TM column (5 mm, 150 mm \times 3.9 mm i.d.) from Tosoh Biosep (Stuttgart, Germany), a Nova-Pak® C18 column (4 mm, 150 mm \times 3.9 mm i.d.) from Waters (Milford, MA USA), and a ABZ+ plus column (5 mm, 150 mm \times 2.1 mm i.d.) from Supelco. All these columns were used in combination with a Pelliguard LC-18 guard column (Supelco). Data were acquired with the Star 5.51 chromatography workstation software (Varian).

2.3. Focused microwave-assisted extraction and solid-phase purification procedures

Meat-based infant foods samples were bought in a local supermarket, and used without being subjected to any further manipulation. The spiking process of infant foods was as it follows: the spiking solution was slowly added to form a dough which was mechanically stirred for several minutes. Afterwards, it was stored in the dark for 24 h. The spiked levels were: 1.45 $\mu\text{g g}^{-1}$ for NH, 0.490 $\mu\text{g g}^{-1}$ for H, 0.443 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Trp-P-2, 1.40 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Trp-P-1, 1.38 $\mu\text{g g}^{-1}$ for A α C, and 0.583 $\mu\text{g g}^{-1}$ for MeA α C.

The optimum extraction process of the samples was as it follows: a 6 mL aliquot of extractant phase (composed by 20%, v/v of methanol in 0.8 M of NaOH) was added to 1 g of infant food sample (spiked or non-spiked), and placed in a Pyrex® tube of 40 mL. After ensuring that an agitation bar was placed in the tube, the extraction tube was introduced into the microwave cavity. The microwave-assisted extraction step was conducted as described in a previous work [25]. Afterwards, the tube was allowed to cool at room temperature and was placed in a water-ice bath for several minutes. This purification step was required for the extraction of lipids and fats, and it has been described in several works [25,27]. Then, the supernatant was introduced in a tube, and centrifuged during 20 min at 4000 rpm. 4 mL of the centrifuged supernatant were then diluted at 20 mL with ammonium acetate 0.5 M, and subjected to the SPE purification step.

The optimized procedure with the C18 SPE cartridge was as it follows: the diluted phase with ammonium acetate coming from the previous step (20 mL) was then loaded on the C18 (100 mg SPE) cartridge. This SPE cartridge was then washed with 5 mL of Milli-Q water, and eluted with 1 mL of the mixture 10 mM BMIm-BF₄:acetonitrile (1:1). An aliquot of 20 μL of this eluted extract was then directly injected in the HPLC system.

2.4. HPLC–ECD procedure

The working potential of the electrochemical detector was set at +1000 mV. The chromatographic separation of the HAs was car-

ried out under isocratic conditions at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The mobile phases were prepared with Milli-Q water and acetonitrile and containing in all cases 2 mM of KCl, as the electrolyte solution for the Ag/AgCl reference electrode of the ECD, and 0.1 mM of EDTA for complexation of possible metal ions present in solution.

Mobile phases with additives include ionic liquids (1, 2, 4, 6, 10 and 12 mM) or ammonium acetate (50 mM). Mobile phases prepared with ILs were adjusted to pH=3.6 with either 10% (v/v) of hydrochloric acid or 0.01 M of sodium hydroxide. Mobile phases prepared with ammonium acetate were adjusted to pH=6 using acetic acid. These mobile phases also contain KCl and EDTA, as it was mentioned before. The purpose to compare ammonium acetate at pH 6 and the ILs at pH 3.6 was based in the fact than both kinds of additives must be compared at their optimum separation conditions. 50 mM ammonium acetate at pH=6 is the most common condition in HPLC–ECD for the determination of amines when using this traditional additive [24]. On the other hand, ILs can be considered similar silanol blockers than TEA, and this additive has been successfully employed at pH 3.6, as it has been shown in several works by our group [28,29].

Mobile phases without additives were also employed for comparative purposes, and were adjusted to pH=3.6 with either 10% (v/v) of hydrochloric acid or 0.01 M of sodium hydroxide. These mobile phases also contain KCl and EDTA, as it was early mentioned.

The optimum chromatographic conditions employed with the meat-based infant foods were: 1 mM of BMIm-BF₄ as mobile phase additive, the Nova-Pak stationary phase, and a value of 19% (v/v) for the acetonitrile content in the mobile phase. This mobile phase also contains KCl and EDTA, and the pH was 3.6, as it was mentioned before.

3. Results and discussion

3.1. Intensity versus potential in the ECD when using ILs as mobile phase additives

Three different ILs (butyl-, hexyl-, and octyl- methylimidazolium tetrafluoroborate) have been studied and compared with the common mobile phase additive ammonium acetate. The utilization of ILs as mobile phase additives rather than ammonium acetate clearly changes the ionic characteristics of the mobile phase. This aspect must be investigated in conjunction with the ECD used in the determination of HAs. Hence, several studies were conducted to investigate the relationships between the potential applied and the mobile phase background current generated. Eluents (with 18%, v/v of acetonitrile) containing 1 mM of ILs, 50 mM of ammonium acetate, or mobile phases free of additives, were tested. Fig. 1A shows the curves of intensity versus potential obtained when varying the applied potential between 0 and +1200 mV. It can be

observed that all eluents containing ILs produced similar background currents, lower than 60 nA, within the range 0–800 mV. The background currents increased exponentially when working with potential values higher than +900 mV. At +1000 mV, which is a common working potential of the ECD for HAs [25], mobile phases containing 50 mM of ammonium acetate showed much higher background currents than those containing ILs (around three times higher). In fact, the improvement was 360% for BMIm-BF₄, 310% for HMIm-BF₄, and 227% for MOIm-BF₄, when compared to ammonium acetate at +1000 mV. This decrease in the background current ensured much cleaner baselines and less noise in the chromatograms when using ILs as additives. It should be noted that these studies have been carried out using the same kind of mobile phases (with KCl and EDTA), being the only difference the substitution of ammonium acetate (used at common working concentrations) by ILs. Therefore, the decreasing in the background signal could be only attributed to the beneficial effects of ILs.

The same comparative study between ILs and ammonium acetate was carried out with mobile phases free of acetonitrile (100% of water), and the obtained results were the same: much lower background noise when using ILs. These results also point out the low influence of the organic solvent content of the mobile phase in the intensity versus potential plots (Fig. 1B).

3.2. Effect of ILs on several chromatographic parameters

Isocratic elution is usually employed in combination with HPLC–ECD for the determination of HAs [24,30]. All the studies with ILs were carried out using isocratic conditions.

Several chromatographic parameters were studied to establish the influence of the ILs as mobile phase additives, among them, the retention factor, the peak-area, the peak-height, and the peak-width of the HAs studied. Table 1 summarizes some of these chromatographic parameters at a representative concentration for the three ILs (2 mM) in each column studied. The additive ammonium acetate has also been included in the table for comparative purposes.

All the HAs presented a similar trend in their retention factors when increasing the IL concentration in the mobile phase, independently of the kind of IL. In general, an increase in the IL concentration generated a decrease in the retention factors of the HAs. This effect was especially significant when compared to eluents free of additives. Nevertheless, this effect was less important at high IL concentrations, and in fact, the retention factors remained practically constant at IL concentrations higher than 2 mM. The change in the retention factors when using ILs as mobile phase additives was lower when the ABZ+ plus stationary phase was being used. In fact, the retention factors of the HAs practically did not change when varying the IL concentrations for this stationary phase. This

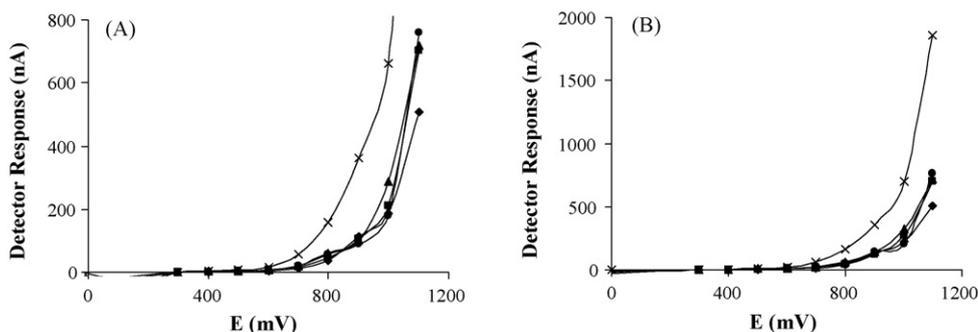


Fig. 1. Potential windows of the ECD when using mobile phases (A) with 18% (v/v) of acetonitrile or (B) free of acetonitrile, composed of (♦) 1 mM BMIm-BF₄, (■) 1 mM HMIm-BF₄, (▲) 1 mM MOIm-BF₄, (×) 50 mM ammonium acetate, and (●) no additives (neither ILs nor ammonium acetate).

Table 1

Effects of ILs at a concentration of 2 mM as mobile phase additives on several chromatographic parameters for the HAs in the three columns.

HA	Additive	Retention factor			Efficiency (N)		
		Nova-Pak	ABZ+	ODS	Nova-Pak	ABZ+	ODS
BMIIm-BF₄							
NH		1.94	0.904	2.28	3,510	2,663	21,202
H		2.40		2.95	13,362		29,364
Trp-P-2		3.88	1.73	4.77	15,265	16,612	31,366
Trp-P-1		5.72	2.63	7.24	17,673	14,246	33,573
A α C		12.8	8.70	15.5	30,445	29,513	39,559
MeA α C		25.0	14.4	30.3	63,658	33,775	45,604
HMIIm-BF₄							
NH		0.937	0.656	1.28	6,481	2,581	14,233
H							
Trp-P-2		1.41	1.24	2.01	25,131	15,434	21,525
Trp-P-1		2.12	1.88	3.15	21,726	12,273	20,257
A α C		12.0	11.8	14.3	53,798	33,932	37,259
MeA α C		23.1	19.6	25.1	90,987	39,611	46,476
MOIm-BF₄							
NH		0.525	0.786	0.610	2,765	965	8,697
H							
Trp-P-2		0.818		0.885	17,621		15,172
Trp-P-1			1.18	1.20		10,564	19,580
A α C		13.6	14.1	14.6	40,938	43,365	30,822
MeA α C		26.6	22.4	–	79,091	51,743	–
50 mM ammonium acetate							
NH		4.46	6.27	7.36	27,925	20,329	31,498
H		6.49	8.97	11.3	24,628	17,227	27,464
Trp-P-2		9.18	11.3	17.2	70,834	35,457	76,203
Trp-P-1		14.1	16.1	23.9	86,006	46,484	113,583
A α C		21.3	25.1	32.4	88,074	48,929	137,005
MeA α C		53.6	53.7	–	161,922	62,346	–

HAs concentrations: NH (1.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$), H (0.490 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Trp-P-2 (0.443 $\mu\text{g mL}^{-1}$), Trp-P-1 (1.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), A α C (4.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and MeA α C (0.583 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

fact is concordant with the characteristics of this stationary phase: high purity silica and low silanol activity.

It should be noted that the retention factors obtained with ammonium acetate as mobile phase additive were much higher than the ones obtained with any IL (Fig. 2) and any stationary phase for all the HAs studied. This noticeable decrease in the retention factors when using ILs as mobile phase additives instead of ammonium acetate must be highlighted. The addition of ILs improved the retention factor, independently in the pH value, although it is obvious that an increase in the pH produced an enhancement of retention factor, due to a decrease in the amines ionization.

It should also be noted that the lowest retention factors were obtained with the ABZ+ plus stationary phase for all the ILs studied. Fig. 2 shows representative chromatograms obtained when ILs and ammonium acetate were used as eluent additives in the Nova-Pak stationary phase. A chromatogram obtained without any mobile phase additive has also been included. It can also be observed that the retention factors of amines greatly decrease with the increase in the lengths of the alkyl substituent of imidazolium cation from butyl, hexyl to octyl. BMIIm-BF₄ ionic liquid provided better resolution for the first four amines (see Fig. 2).

It must be highlighted that the peak-widths observed with ammonium acetate were much higher than those obtained with ILs in all the stationary phases and at any IL concentration. Therefore, ILs improved the peak-shape of the HAs studied. Fig. 3 shows a representative example for Trp-P-1 with the Nova-Pak stationary phase and MeA α C with the ABZ+, with respect to the influence of ILs or ammonium acetate as mobile phase additives in the variation of the peak-width.

In general, and with a few exceptions, the use of ILs as mobile phase additives generated higher peak-areas for NH and H when compared with ammonium acetate. But for the other HAs, similar or lower peak-areas were obtained. All HAs presented the same trend with respect to peak-heights: in general, the highest peak-heights

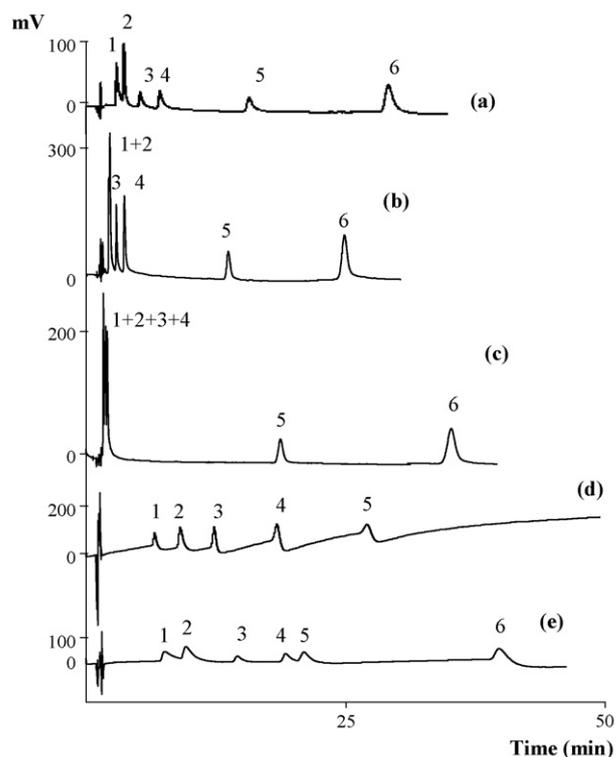


Fig. 2. Chromatograms of all amines in a Nova-Pak stationary phase using (a) 10 mM BMIIm-BF₄, (b) 10 mM HMIIm-BF₄, (c) 10 mM MOIm-BF₄, (d) 50 mM ammonium acetate, (e) without additives in the mobile phase. HAs and concentrations: (1) NH (1.45 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (2) H (0.490 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (3) Trp-P-2 (0.443 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (4) Trp-P-1 (1.40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), (5) A α C (4.92 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and (6) MeA α C (0.583 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Retention time of MeA α C in (d) is higher than 50 min. The acetonitrile content was 18% (v/v).

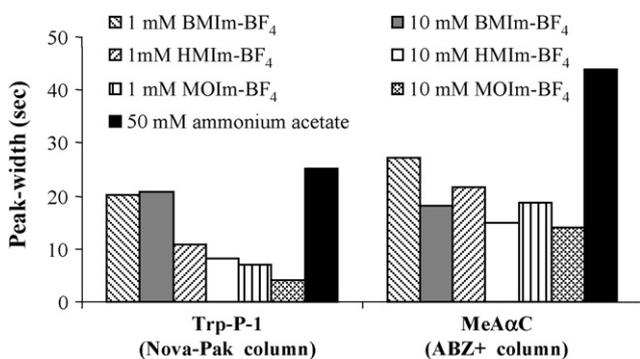


Fig. 3. Influence on the peak-widths of ILs and ammonium acetate for Trp-P-1 in the Nova-Pak column (left) and MeAαC in the ABZ+ column (right). The concentration of HAs is as indicated in Fig. 2.

were obtained with the ABZ+ plus, independently of the additive. For NH and H, the peak-heights observed with ammonium acetate were much lower than those obtained with ILs.

As a general trend, it can be concluded that the increases in the IL concentration caused decreases in both the retention factors and the peak-widths of the studied amines, especially when compared with ammonium acetate. At a representative concentration of IL (1 mM) and with the Nova-Pak column, the decrease in peak-widths ranged from 15.0% (H) to 31.1% (MeAαC) for BMIm-BF₄; from 11.2% (H) to 58.5% (Trp-P-2) for HMIm-BF₄; and from 6.46% (H) to 72.1% (Trp-P-1) for MOIm-BF₄, when compared with the peak-width of these HAs obtained using ammonium acetate as mobile phase additive. The exception was NH, which had the same peak-width with all mobile phase additives. It can clearly be observed in Fig. 2 that the total analysis time was lower when using ILs (at 10 mM concentration in the figure) than with ammonium acetate (50 mM).

Two different effects on the efficiency (calculated as plate number) [31] can be observed depending on the kind of amine. NH, H, Trp-P-1 and Trp-P-2 experimented slight increases in the efficiency when increasing the IL concentration. This effect was more significant at high IL concentrations. Furthermore, the increases were higher for the IL BMIm-BF₄ and for the ODS stationary phase. On the other hand, AαC and MeAαC present no differences in efficiencies among columns, but they presented slight increases in the efficiencies with the IL concentration for all the ILs. If these efficiencies are compared with those obtained with the additive ammonium acetate, several effects can be observed. In general, NH and H presented higher efficiencies with ammonium acetate in all the stationary phases, being the exception H in the stationary phase ODS with the BMIm-BF₄. Trp-P-1 and Trp-P-2 always present higher efficiencies when ammonium acetate was used as mobile phase additive. AαC and MeAαC presented similar efficiencies with ILs and ammonium acetate for all the stationary phases studied at higher concentrations of ILs. Table 1 shows several of these efficiencies obtained for all the HAs at a representative concentration of 2 mM for all the ILs in the three stationary phases

studied. Ammonium acetate is also included for comparative purposes. As it can be seen from Table 1, in general, there were not significant improvements in the efficiencies when ILs were used as mobile phase additives.

Consequently, ILs seem to be more favorable than ammonium acetate as mobile phase additives for the chromatographic determination of HAs by HPLC–ECD, decreasing the chromatographic retention time and improving the peak-shapes.

3.3. Influence of the acetonitrile content in the mobile phase when using ILs as additives

The retention data of the studied HAs were examined to elucidate the role of the organic modifier (acetonitrile in our case) in the separation of HAs on the three studied columns when using HPLC–ECD and ILs as mobile phase additives.

To carry out this study, the percentage of acetonitrile was varied from 5 to 50% (v/v) for the studied ILs and columns. The obtained plots of $\log k$ versus the percentage of acetonitrile were acceptably linear in the whole studied range ($0.96 < R < 0.99$), following the well-known Soczewinski–Wachmaister's equation [32,33]. Table 2 lists the obtained values for $\log k_w$ (the retention factor of the analyte when the mobile phase is free of acetonitrile), S (the elution strength in aqueous-organic eluents without additives) and R for each amine in the Nova-Pak column, as a representative example, when using mobile phases with or without ILs. ILs concentration was 1 mM in all cases.

As a general trend, the three ILs as mobile phase additives decreased the $\log k_w$ term and increased the S term when compared to mobile phases without additives. These two effects were opposite. At constant S , when $\log k_w$ decreases there will be a decrease in the analyte retention. On the other hand, at constant $\log k_w$, an increase in S will produce an increase in the analyte retention [10]. For each HAs, the calculated $\log k_w$ for each ILs and each column were different from those obtained in absence of IL additives in the mobile phase. These differences in the $\log k_w$ values probably reflect differences in the way that ILs interact with the bonded phases, that is, differences in the solvation of the stationary phases due to the ILs [34]. Another explanation can lie in the presence of selective analyte-IL interactions in the mobile phase. In this case of ILs as mobile phase additives, it seems that both effects: adsorption on the stationary phase, and ion-pairing with the basic analytes, are taking place [10].

All the studied amines showed the expected behavior, the retention factor decreased linearly as the concentration of the organic modifier increased. The six studied amines can be classified in two groups depending on their behavior when comparing among them. One group is constituted by NH, H, Trp-P-2 and Trp-P-1, and the second group by the amines AαC and MeAαC. In the first group of amines it was observed important differences in the $\log k_w$ values for the three ILs and the three columns. In addition, the S values were very similar for each compound with the three ILs when using the Nova-Pak column (see Table 2). This is the reason why there were important differences in the obtained $\log k$ values with this

Table 2
Extrapolated zero organic phase retention factor ($\log k_w$) and elution strength (S) changes induced by BMIm-BF₄, HMIm-BF₄ and MOIm-BF₄ (at a concentration of 1 mM) in a Nova-Pak stationary phase.

HA	Absence of ILs additives			BMIm-BF ₄			HMIm-BF ₄			MOIm-BF ₄		
	$\log k_w$	S	R	$\log k_w$	S	R	$\log k_w$	S	R	$\log k_w$	S	R
NH	1.24	−0.060	0.99	1.38	−0.048	0.98	0.899	−0.042	0.96	0.570	−0.052	0.99
H	1.30	−0.062	0.99	1.48	−0.050	0.97	1.02	−0.046	0.97	0.763	−0.065	0.99
Trp-P-2	1.58	−0.073	0.99	1.77	−0.056	0.97	1.33	−0.052	0.98	1.02	−0.064	0.99
Trp-P-1	1.93	−0.083	0.99	1.76	−0.046	0.97	1.60	−0.057	0.98	1.31	−0.070	0.99
AαC	2.25	−0.051	0.99	2.27	−0.056	0.99	2.10	−0.053	0.98	2.11	−0.064	0.99
MeAαC	2.58	−0.055	0.99	2.04	−0.041	0.99	2.29	−0.051	0.98	2.52	−0.071	0.99

group of amines when using the Nova-Pak stationary phase. However, there were differences in the S values when the ABZ+ plus or the ODS stationary phases were used, and therefore the differences in the obtained $\log k$ values were not so important. In the second group of amines ($\text{A}\alpha\text{C}$ and $\text{MeA}\alpha\text{C}$), it can be observed similar values for $\log k_w$ values with the three ILs, as well as similar $\log k$ values.

3.4. Analytical characteristics of the chromatographic method when using ILs as additives

Once the chromatographic behavior of some HAs by HPLC–ECD was studied in the presence of ILs as mobile phase additives, it resulted interesting to select the best chromatographic conditions for each IL, and then to compare the quality parameters of the chromatographic methods obtained under these optimum conditions. The selection of the optimum chromatographic parameters for each IL was focused in maximizing the chromatographic resolution of the studied amines, considering optimum values when $R_s > 1.5$ [31]. This resolution was especially monitored with H and NH, because the separation of these HAs is in general problematic.

The Nova-Pak column was selected in this comparative study and the selected ionic liquid concentration was 1 mM. In general, the best peak resolution and enhancement were obtained with this column, as well as the adequate retention times and baseline. The ABZ+ plus column gave the lowest retention times; however, the amines H and NH could not be resolved at any IL concentration. The ODS column gave the highest retention times for the three ILs.

The optimal mobile phase composition was selected attending to the results obtained when studying the effect of the acetonitrile content, and intending to improve the peak resolution at different eluent composition. The selected acetonitrile contents were 19% (v/v) for BMIm-BF_4 (R_s value of 3.34 for NH–H), 20% (v/v) for HMIm-BF_4 (R_s value of 1.5 for NH–H), and 15% (v/v) for MOIm-BF_4 (NH and H could not be resolved but the R_s was excellent for the rest of HAs studied).

Table 3 lists the quality parameters of the chromatographic method for the three ILs in the optimal conditions early mentioned. It can be observed that the precision of the proposed chromatographic methods, calculated as relative standard deviation,

Table 3

Figures of merit of the chromatographic methods obtained for each IL under the optimum conditions: Nova-Pak column and 1 mM of IL concentration in the mobile phase.

HA	IL	Linearity range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	(Slope \pm SD) $\times 10^{-5}$	R	RSD ^a (%)
BMIm-BF ₄ and 19% (v/v) of acetonitrile					
NH		0.05–2.42	19.8 \pm 0.1	0.999	7.0 (1.45)
H		0.02–0.82	69 \pm 1	0.998	6.2 (0.49)
Trp-P-2		0.02–0.74	31.4 \pm 0.5	0.999	2.6 (0.44)
Trp-P-1		0.05–2.33	19.4 \pm 0.5	0.998	6.9 (1.40)
A α C		0.06–3.22	5.0 \pm 0.1	0.999	5.8 (1.93)
Me α AC		0.02–0.97	95 \pm 1	0.999	2.2 (0.58)
HMIm-BF ₄ and 20% (v/v) of acetonitrile					
NH		0.12–2.42	19.3 \pm 0.1	0.986	7.0 (1.45)
H		0.05–0.82	48.0 \pm 0.2	0.995	7.0 (0.49)
Trp-P-2		0.04–0.74	185.0 \pm 0.4	0.998	7.9 (0.44)
Trp-P-1		0.12–3.22	103.0 \pm 0.1	0.999	5.6 (1.40)
A α C		0.16–3.22	27.3 \pm 0.2	0.986	8.0 (1.93)
Me α AC		0.05–0.97	723 \pm 2	0.998	8.3 (0.58)
MOIm-BF ₄ and 15% (v/v) of acetonitrile					
NH+H		0.16–2.23	1.5 \pm 0.1	0.991	8.3 (1.94)
Trp-P-2		0.12–2.33	21.9 \pm 0.3	0.999	2.8 (0.44)
Trp-P-1		0.16–3.22	12 \pm 2	0.965	8.0 (1.40)
A α C		0.05–0.97	27.1 \pm 0.1	0.992	7.6 (1.93)
Me α AC		0.17–3.23	778 \pm 1	0.999	7.6 (0.58)

^a Run-to-run ($n = 5$) on day-to-day ($n = 3$) samples analyzed. Values in parenthesis are the concentration values used ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

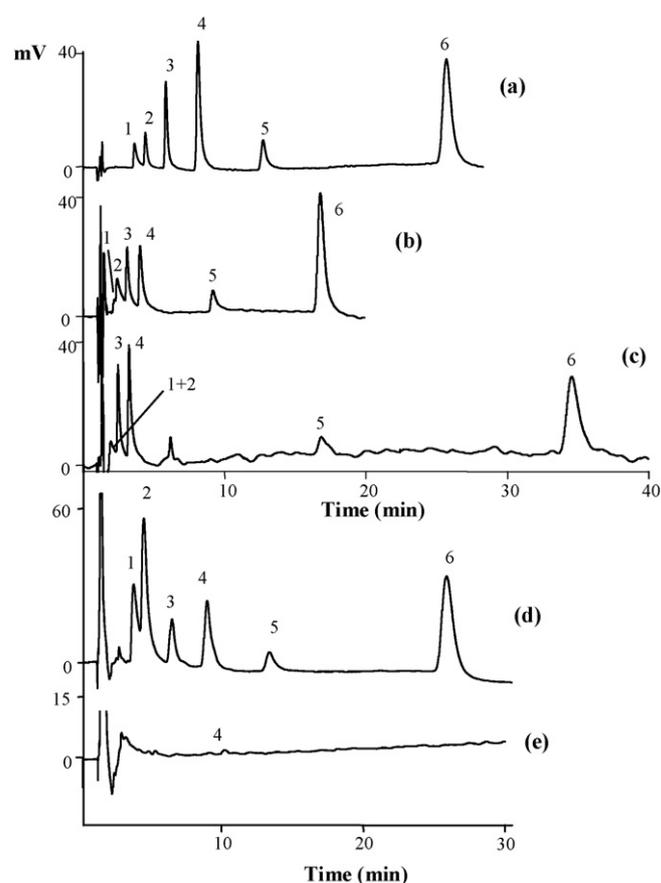


Fig. 4. Chromatograms obtained with the Nova-Pak column under the conditions: (a) 10 mM BMIm-BF_4 and 19% (v/v) of acetonitrile; (b) 10 mM HMIm-BF_4 and 20% (v/v) of acetonitrile; and (c) 10 mM MOIm-BF_4 and 15% (v/v) of acetonitrile, (d) spiked chicken infant food extracted according to the optimal conditions and (e) non-spiked chicken infant food extracted according to the optimal conditions. Concentrations of HAs in (a–c) as indicated in the caption of Table 1. Concentrations of HAs spiked in (d) as indicated in Section 2.

ranged between 2.2 and 8.3%. In addition, all the calibrations presented good linearity ($R > 0.99$), with the exception of Trp-P-1 when using MOIm-BF_4 . Fig. 4 shows some representative chromatograms obtained under the optimal conditions. It should be noted that the total chromatographic time was lower than 40 min in all cases.

An important improvement was obtained in the detection limits. Table 4 lists the detection limits obtained when using the ILs under the optimal conditions. They were calculated as three times the signal to noise ratio. Table 4 also includes a comparison with the LODs obtained in a previous work using HPLC–ECD with ammonium acetate as mobile phase additive [25] and those obtained

Table 4

Detection limits of the chromatographic methods under the optimum conditions.

HA	LOD (ng injected)				
	BMIm-BF ₄ ^a	HMIm-BF ₄ ^a	MOIm-BF ₄ ^a	[25] ^b	[30] ^a
NH	0.122	0.070	0.580	2.68	0.025
H	0.124	0.019		1.13	0.025
Trp-P-2	0.010	0.058	0.014	0.41	0.005
Trp-P-1	0.026	0.280	0.052	0.16	0.054
A α C	0.026	0.720	0.188	1.62	0.022
Me α AC	0.002	0.190	0.520	2.14	0.033
NH	0.122	0.070	0.580	2.68	0.025

^a Calculated as three times the signal to noise ratio.

^b Calculated as described by Cuadros et al. [35].

by other authors [30]. The lowest detection limits were obtained with BMIm-BF₄. LODs were lower when using ILs than when using ammonium acetate and, with some exceptions, were comparable to those obtained by other authors.

As a general trend, ILs as mobile phase additives improved the calibration curves linearity and the detection limits for all the studied amines compared with ammonium acetate [25]. This effect was especially remarkable when using BMIm-BF₄ as additive.

3.5. Optimization of the extraction method and application to meat-based infant foods

The significant performance of ILs as mobile phase additives in HPLC–ECD for several HAs encouraged us to develop an analytical application. The extraction of HAs from food products was usually carried out using a method described by Gross and other authors [24,36,37]. This method is mainly characterized for presenting several SPE steps, due to the complexity of the food matrices. The present application intends to utilize only one SPE step, considering that a focused microwave-assisted extraction step [25] in conjunction with a freezing step is previously conducted [25,27]. Hence, the proposed second clean-up and preconcentration step was a solid-phase extraction procedure.

The percentage of methanol in the extractant phase was optimized in order to ensure a good solubilization of the samples when applying microwaves, altogether with a high retention of amines in the SPE cartridge. A percentage of 20% (v/v) of methanol in the extractant phase (sodium hydroxide) was selected as a compromise solution.

The pH is another important parameter that must be controlled before loading the SPE cartridges. Extractant solutions with sodium hydroxide concentration of 0.05 M are good enough to ensure a good sample solubilization by microwaves [25]. However, such low concentration values do not ensure a good retention of the amines on the SPE cartridges. At the same time, high sodium hydroxide concentrations can plug the cartridges. Some authors have recommended using high pH extractant solutions followed by a dilution of the sample extracts with ammonium acetate to reach a pH value of 8, before loading the SPE cartridges [37]. Therefore, it was decided to use a high hydroxide concentration as extractant solution (0.8 M), and then to dilute the obtained supernatant with ammonium acetate to reach a pH value of 8. In addition, SPE cartridges were previously conditioned with 500 µL of ammonium acetate. A washing step of the loaded samples was also introduced to eliminate sample matrix interferences, ensuring that no losses of HAs were taking place. Consequently, cartridges were washed with 5 mL of Milli-Q water before the sample elution.

A careful selection of the SPE elution solvent was also carried out. Gross and some other authors make use of the mixture methanol:ammonia (9:1) as the elution solvent [36,37]. However, the injection of such mixture generated a noisy baseline in our optimized chromatographic system. Several mixtures BMIm-BF₄:acetonitrile, with IL concentrations ranging from 1 to 25 mM, were tested to ensure both good elution and chromatographic compatibility. The optimum mixture was formed by 10 mM BMIm-BF₄:acetonitrile (1:1), with an optimum elution volume of 1 mL. It should be highlighted that ILs solutions are used, for first time, as eluting agents in SPE.

The whole optimized method was applied to the determination of HAs in two kinds of meat-based infant foods: veal and chicken. It has been described that the macro-constituents of meat samples, mainly the lipids, are responsible of the low extraction efficiencies usually obtained when determining HAs in meat extracts [38]. This problem has relatively been overcome by developing tedious cleaning procedures involving several SPE steps [36,37]. Table 5 shows the obtained extraction efficiencies as well as the method precision

Table 5

Extraction efficiency of the proposed extraction method when working with spiked samples.

HA	Recovery ± SD ^a veal infant foods	Recovery ± SD ^a chicken infant foods
NH	48 ± 2	41 ± 5
H	70 ± 3	47 ± 1
Trp-P-2	66 ± 6	61 ± 4
Trp-P-1	79 ± 16	55 ± 4
ΑαC	69 ± 2	89 ± 7
MeΑαC	81 ± 5	60 ± 5

^a n = 5.

when analyzing meat-based infant foods with the proposed extraction method and HPLC–ECD. It should be highlighted that the obtained recoveries were comparable to the ones obtained with similar matrices [36–39]. Furthermore, the proposed extraction method required less clean-up procedures than the ones usually described in the literature, decreasing therefore the overall analytical time. Average recoveries of 69 and 59% were obtained for spiked veal and chicken infant foods, respectively. Higher recoveries were generally obtained with veal infant foods, except for ΑαC. Lowest recoveries were always obtained with NH in both kinds of samples. The obtained precision, expressed as relative standard deviation, varied from 3.6% for ΑαC to 20.5% for Trp-P-1 in the veal infant foods; and from 2.5% for H to 12.2% for NH in the chicken infant foods. Fig. 4 shows representative chromatograms of spiked (Fig. 4d) and non-spiked (Fig. 4e) chicken infant food samples subjected to the whole extraction optimized procedure.

The obtained detection limits for the overall method were 9.15 ng g⁻¹ for NH, 9.30 ng g⁻¹ for H, 0.780 ng g⁻¹ for Trp-P-2, 1.95 ng g⁻¹ for Trp-P-1, 1.95 ng g⁻¹ for ΑαC, and 0.165 ng g⁻¹ for MeΑαC. Similar detection limits have been reported for lyophilized meat extract [40] and infant food samples [39]. Trp-P-1 was the only amine detected in the studied infant foods, but it could not be quantified.

4. Conclusions

It has been shown that ILs significantly decrease the retention factors and peak-widths of a group of HAs in HPLC–ECD, especially when compared with the common mobile phase additive ammonium acetate. An important improvement was also observed in the background currents of the ECD, a lower noise about 300% improvement was obtained with ILs. A comparison between the studied C18 stationary phases reflected that ILs produced best improvements in the less modified silica stationary phase with moderate silanol activity.

The significant performance of ILs as mobile phase additives in HPLC–ECD encouraged us to develop an analytical application for the HAs. The chromatographic conditions were optimized to carry out the application with meat-based infant foods. Furthermore, an extraction method based on a focused-microwave-assisted extraction followed by a SPE procedure was completely optimized, with important reductions in the overall extraction time. Finally, both the optimized extraction and chromatographic method were successfully applied to the determination of heterocyclic amines in meat-based infant food samples, with detection limits in the nanogram per gram region.

Acknowledgements

A. Martín-Calero thanks the Consejería de Industria del Gobierno de Canarias for her contract, reference ID-TF-07/074. This work was supported by the project CTQ2007-67084/BQU and CTQ2008-06253/BQU financed by Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

References

- [1] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 2nd edn., Wiley, New York, 1997.
- [2] S.D. Rogers, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 57.
- [3] C. Stella, S. Rudaz, J.-Y. Gauvrit, P. Lanteri, A. Huteau, A. Tchaplá, J.-L. Veuthy, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 89.
- [4] F. Gritti, C. Perdu, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 1180 (2008) 73.
- [5] J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 757.
- [6] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1007 (2003) 39.
- [7] R. Kaliszán, M.P. Marszall, M.J. Markuszewski, T. Baczek, J. Pernak, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 263.
- [8] M.P. Marszall, T. Baczek, R. Kaliszán, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1138.
- [9] Y. Polyakova, Y.M. Koo, K.H. Row, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 11 (2006) 1.
- [10] M.J. Ruiz-Ángel, S. Cardá-Broch, A. Berthod, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 202.
- [11] M.P. Marszall, R. Kaliszán, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 37 (2007) 127.
- [12] M.P. Marszall, T. Baczek, R. Kaliszán, *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 172.
- [13] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Huget, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4071.
- [14] X. Han, D.W. Armstrong, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 1079.
- [15] J. Liu, G. Jiang, Y. Chi, Y. Cai, Q. Zhou, J.-T. Hu, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870.
- [16] A. Berthod, S. Cardá-Broch, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 168.
- [17] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6453.
- [18] V. Pino, J.L. Anderson, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A* 1182 (2008) 145.
- [19] Q. Wang, G.A. Baker, S.N. Baker, L.A. Colón, *Analyst* 131 (2006) 1000.
- [20] M. Nagao, T. Ushijima, N. Watanabe, E. Okochi, M. Ochiai, H. Nakagama, T. Sugimura, *Environ. Mol. Mutagen.* 39 (2002) 158.
- [21] M. Sanz-Alaejos, V. González, A.M. Afonso, *Food Addit. Contam.* 25 (2008) 2.
- [22] R.J. Turesky, *Toxicol. Lett.* 168 (2007) 219.
- [23] M. Sanz-Alaejos, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. B* 862 (2008) 15.
- [24] M.T. Galcerán, P. País, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 655 (1993) 101.
- [25] A. Martín-Calero, V. Pino, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 30 (2007) 27.
- [26] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. B* 802 (2004) 45.
- [27] J. Seo, H.-Y. Kim, B.C. Chung, J. Hong, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 303.
- [28] L. Cárdenes, A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Lett.* 39 (2006) 405.
- [29] A. Martín-Calero, J.H. Ayala, V. González, A.M. Afonso, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 259.
- [30] E. Bermudo, V. Ruiz-Calero, L. Puignou, M.T. Galcerán, *Anal. Chim. Acta* 536 (2005) 83.
- [31] V.R. Meyer (Ed.), *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Chichester, England, 1994.
- [32] E. Soczewinski, C.A. Wachtmeister, *J. Chromatogr.* 7 (1962) 311.
- [33] J. Flieger, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 207.
- [34] B.K. Lavine, J.P. Ritter, S. Peterson, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 83.
- [35] L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, C. Jiménez-Linares, M. Román-Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [36] G.A. Gross, A. Grüter, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 271.
- [37] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223.
- [38] F. Toribio, R. Busquets, L. Puignou, M.T. Galcerán, *Food Chem. Toxicol.* 45 (2007) 667.
- [39] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, I. Zagnoni, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 833.
- [40] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 267.

Ionic liquids as desorption solvents and memory effect suppressors in heterocyclic aromatic amines determination by SPME–HPLC fluorescence

Aurora Martín-Calero · Juan H. Ayala ·
Venerando González · Ana M. Afonso

Received: 30 October 2008 / Revised: 3 December 2008 / Accepted: 5 December 2008 / Published online: 23 December 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The beneficial effects of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIm-BF₄) ionic liquid (IL) as mobile phase additive, desorption solvent, and memory effect suppressor in solid-phase microextraction (SPME)–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of six heterocyclic aromatic amines have been evaluated for the first time. Several chromatographic parameters have been evaluated in the presence or absence of IL or using triethylamine as the most common mobile phase additive, with a Nova-Pak® C18 stationary phase. This IL was found to be clearly superior to triethylamine for efficiency as well as peak shape enhancement and sensitivity increase. SPME was chosen because it is faster than conventional extraction techniques and allowed us to minimize the use of organic solvents. However, memory effect may become a problem when a high-sensitivity detector is used. The appropriate conditions for the desorption step and to eliminate the memory effect involving BMIm-BF₄ were established and optimized. The method was applied for the determination of these compounds in commercial meat extracts.

Keywords Ionic liquids memory effect · Solid phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography · Fluorescence detection · Heterocyclic aromatic amines

Introduction

Room-temperature ionic liquids (ILs), salts that are liquid at ambient temperature, are normally made up of relatively large organic cations and inorganic or organic anions. ILs are environmentally benign, nonvolatile, and nonflammable solvents. Most of them have good solubility in water and are stable in air [1]. Because of these properties, ILs are used as environmentally friendly solvents in sample preparation [2], especially in separating analytes with solvents such as liquid–liquid extraction [3], single drop direct-immersion and headspace liquid-phase microextraction [4], and as new solid-phase microextraction (SPME) stationary phases [5]. ILs could be used as desorption solvents in SPME of organic compounds, but to our knowledge, there are no reports of this application.

Recently, an increasing attention has been paid to the use of ionic liquids as new modifiers of conventional mobile phases for reversed- and normal-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) [6–8]. The investigations have shown that as mobile phase additives, ILs could play a multiplicity of roles, such as blocking the residual silanol groups, modifying the stationary phase, or to be as active ion-pairing agents. Separation of amines using ILs as mobile phase additives have been proposed [9–12], but not for heterocyclic aromatic amines (HAs), which are known for their potent mutagenic and carcinogenic response, and they have also been linked to cancer [13–15]. All the reported applications of ILs as mobile phase additives include HPLC with UV or diode array detection. There are few reported studies using HPLC with fluorescence detection and ILs. The fluorescent detection, besides its inherent sensitivity, could eliminate one of the limitations of the applications of ILs in HPLC associated to the

A. Martín-Calero · J. H. Ayala · V. González · A. M. Afonso (✉)
Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science,
University of La Laguna,
38205 La Laguna, Spain
e-mail: aafonso@ull.es

fact that several ILs are not UV transparent at wavelengths where analytes are detected.

The first aim of this work was to study for the first time the beneficial effect of 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (BMIm-BF₄) ionic liquid as mobile phase additive in HPLC with fluorescence detection for the determination of six HAs. Several chromatographic parameters, including peak tailing, efficiency, peak width, peak area, peak height, and retention factor, were evaluated in presence of ILs and compared with triethylamine (TEA), the most popular silanol suppressing agent. This study included the effect of IL using a conventional reversed-phase Nova-Pak® C18 column instead of specific columns for the HAs separation [16].

The considerable complexity of food matrices, their low concentrations in HAs (nanograms per gram), and the necessity to introduce successive steps to get appropriate selectivity justify the laborious available analytical procedures. The coupling SPME–HPLC simplifies considerably, compared with other methodologies, the treatment of samples for the determination of less polar HAs [17].

The other aims of this work were to study the IL of BMIm-BF₄ as desorption solvent and memory effect suppressor in SPME. It is known that in SPME–HPLC, the desorption process and the elimination of memory effect are critical steps. As it was noted by Chen and Pawliszyn [18], the desorption procedure is extremely important in SPME–HPLC and needs to be optimized for each application with different solvent compositions adjusted for solubility of target analytes in the mobile phase. On the other hand, memory effect or carry over may become a problem when a high-sensitivity detector is used in order to allow analysis of very small amounts of analyte [19]. Thus, in this work, several parameters, including desorption solvent composition and desorption time, cleaning solution composition, and number of flushes needed to eliminate memory effect, were evaluated and optimized. Finally, in order to evaluate the applicability of the proposed method, recovery studies in meat extract samples were carried out.

Experimental

Chemicals and reagents

The studied amines were as follows: 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), and 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (AαC), purchased from Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada); 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeAαC), 9*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (NH), and 1-methyl-9*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (H), purchased from Aldrich-Chemie (Beerse, Belgium). Stock standard

solutions in methanol were prepared containing 92 μg mL⁻¹ of H; 520 μg mL⁻¹ of NH; 400 μg mL⁻¹ of Trp-P-2, Trp-P-1, AαC, and MeAαC. These solutions were kept refrigerated at 0 °C protected from light and used for the preparation of working standard solutions.

The ionic liquid BMIm-BF₄ was used as mobile phase additive and purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

All solvents were of HPLC or analytical-reagent grade. Water was purified using a Milli-Q gradient A10 system from Millipore (Billerica, MA, USA). All solvents were filtered through a 0.45 μm Durapore® membrane filter (Millipore) before being used in the chromatographic system.

Instrumentation

Focused microwave-assisted extractions were performed at atmospheric pressure using a CEM Focused Microwave™ Synthesis System (Matthews, NC, USA) equipped with an infrared temperature control system and stirring and cooling options. The cooling was carried out by means of a flow of air. The ChemDriver™ software (CEM) was used for data acquisition.

A Carbowax-templated resin (CW-TPR 50 μm) fiber coating from Supelco (Bellefonte, PA, USA) was used. The fiber was conditioned with the mobile phase until stable baseline was obtained.

The HPLC equipment was a liquid chromatograph consisting of a delivery solvent ProStar 230 from Varian (Palo Alto, CA, USA) equipped with SPME–HPLC interface with Rheodyne valve (Supelco) to perform the microextraction. A Waters (Milford, MA, USA) 474 scanning fluorescence detector with a resolution of ±2 nm was used. The analytical column was a Nova-Pak® C18 column (4 μm, 150 mm × 3.9 mm i.d.) from Waters and a Pelliguard LC-18 guard column (Supelco). Data were acquired with the Star 5.51 chromatography workstation software (Varian).

Sample treatment

Meat extracts samples, bought in a local supermarket, were spiked with a solution slowly added to form a dough, which was mechanically stirred for several minutes. Afterward, the samples were stored in the dark for 24 h. The spiked levels were as follows: 23.8 ng g⁻¹ for NH, 8.06 ng g⁻¹ for H, 7.30 ng g⁻¹ for Trp-P-2, 7.68 ng g⁻¹ for Trp-P-1, 22.1 ng g⁻¹ for AαC, and 19.2 ng g⁻¹ for MeAαC.

The extraction process of the samples was previously optimized [20]: a 6 mL aliquot of extractant phase (composed by 2.5% v/v of methanol in 0.05 M NaOH) was added to 0.5 g of meat extract sample (spiked or non-spiked) and placed in a Pyrex® tube of 40 mL. The

extraction tube was then introduced into the microwave cavity with an agitation bar placed in the tube. The optimum extraction was performed under a maximum radiation of 20 W for the microwave oven power. Samples were exposed to microwaves until the temperature reached 80 °C and then kept at this temperature for 1 min. The sample was kept stirred during the entire microwave extraction process. Then, the tube was allowed to cool at room temperature. The sample was then placed in a water-ice bath for several minutes. This purification step was required for the removal of lipids and fats. Afterward, the supernatant was introduced in a tube and centrifuged for 20 min at 4,000 rpm; 0.5 mL of the centrifuged supernatant was then diluted at 5 mL with extractant phase 2.5% *v/v* of methanol in 0.05 M NaOH for SPME.

SPME–HPLC procedure

Aliquots of 4 mL of standard solutions or samples with a total methanol content of 2.5% in 0.05 M NaOH were placed in 4-mL glass vials. These vials were sealed with a septum-type cap, and the fiber was directly immersed in the solutions for 30 min at room temperature. Solutions were stirred (800 cycles min^{-1}) with a small stir bar to increase the equilibrium rate.

After the extraction, the fiber was withdrawn into the needle, and the needle was removed from the septum and was inserted into the desorption chamber of the SPME–HPLC interface. This interface was off-line and under ambient pressure when the injection valve was in load position. The desorption chamber (60 μL) was previously filled with 25 mM BMIm-BF₄–methanol (4:6) mixture, and the fiber was soaked for 4 min. Afterward, the valve was switched to inject position and the analytes were delivered to the column. The valve was returned to load position after 1 min (desorption time), and the chamber was flushed with three portions (250 μL) of BMIm-BF₄–methanol mixture. Finally, the SPME fiber was removed.

Memory effect study

To study the memory effect, the SPME fiber used in the above extraction, but without flushing the chamber, was soaked in the desorption chamber with 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6) for 4 min. Then, the valve was switched to inject position for 1 min, and when the valve was returned to the load position, the chamber and the fiber were flushed with one portion of 250 μL of methanol or 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6) depending on the experiment. After the HPLC analysis of HAs, successive fiber soakings were carried out in the desorption chamber filled with the BMIm-BF₄–methanol mixture and flushed with 250 μL portions of methanol or 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6). This

procedure was repeated until no memory effect was observed, <0.1% [19].

HPLC analysis

The chromatographic separation of HAs was carried out with a binary mobile phase at a flow-rate 1 mL min^{-1} , 1-butyl-3-methylimidazolium 1 mM, pH 3.6 (A solvent), and acetonitrile (B solvent). The gradient program was as follows: 19% B in A from 0 to 13 min; 19–30% B in A, 13.01–16 min; 30% B in A, 16.01–22 min; returned to initial conditions in 5 min; and 5 min of post-run delay.

The fluorescent detection was performed using 264/410 nm as excitation and emission wavelengths.

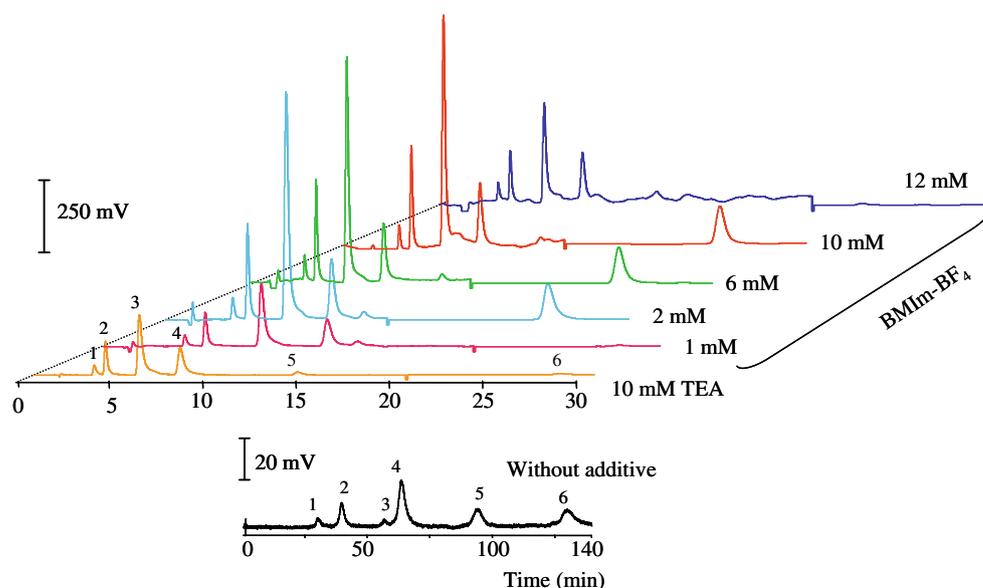
Results and discussion

BMIm-BF₄ as mobile phase additive in HPLC separation of HAs

It is known that when HAs are retained in the stationary phase, residual silanols on the surface of the stationary phase can interact with the analytes, and it would result in a poor separation of these basic compounds. Even a small amount of silanol present in the stationary phase can cause measurable peak broadening and peak asymmetry deterioration on these compounds. Amine additives such as TEA are generally used in HPLC as silanol masking agents for the separation of these compounds. Ionic liquids, with a similar structure to TEA, can also shield from residual silanols and improve the separation of HAs. He et al. [9] and later Ruiz et al. [21] have shown that the ILs of the family of the imidazolium tetrafluoroborate and, particularly the BMIm-BF₄, are better than TEA as suppressor of the silanol groups effect when they are used as mobile phase additives in HPLC for the separation of ephedrine and β -blockers, respectively. These results encouraged us to study if this IL was an appropriate as mobile phase additive in HPLC determination of HAs.

Figure 1 shows chromatograms of HAs with different concentrations of BMIm-BF₄ under isocratic conditions and 18% (*v/v*) of acetonitrile content. A chromatogram obtained with mobile phase free of additive and with 10 mM TEA as mobile phase additive has also been included for comparative purposes. As it can be seen in Fig. 1, the addition of IL to the mobile phase influenced the chromatographic behavior of HAs. Retention times drastically decreased from 0 to 2 mM of BMIm-BF₄. Concentrations higher than 2 mM did not modify these retention times. If we compare the chromatograms obtained with 10 mM BMIm-BF₄ and using 10 mM TEA, we can observe that the retention times were similar for the first four amines (NH, H, Trp-P-

Fig. 1 Chromatograms of all amines using different BMIm-BF₄ concentrations, 10 mM TEA, and without additive in the mobile phase. HAs and concentrations: 1 NH (20.8 ng mL⁻¹), 2 H (5.50 ng mL⁻¹), 3 Trp-P-2 (8.00 ng mL⁻¹), 4 Trp-P-1 (3.52 ng mL⁻¹), 5 AαC (72.0 ng mL⁻¹), and 6 MeAαC (7.60 ng mL⁻¹). The acetonitrile content was 18% (v/v)



2, and Trp-P-1), while for AαC and MeAαC, the retention times were lower when 10 mM BMIm-BF₄ was used as mobile phase additives.

It should be noted that, with a few exceptions, the use of BMIm-BF₄ as mobile phase additive generated higher peak areas than those obtained with TEA as it can be seen in Fig. 1. At concentrations higher than 2 mM, BMIm-BF₄ peak areas and peak heights remained practically constant, although at concentrations higher than 12 mM, a decrease in peak areas and peak heights was obtained.

Other advantage that can be highlighted with BMIm-BF₄ as mobile phase additive was the improvement in the peak shapes. Peak tailing, also known as tailing factor (Tf), was used to measure peak symmetry and was calculated according to the following equation:

$$Tf = 0.5 \times \left(\frac{t_b - t_a}{t_R - t_a} \right)$$

where t_R was the retention time, and t_a and t_b were the retention times of points on the leading and tailing edges of the peak measured at 5% of peak height. Table 1 shows the tailing factors obtained when 10 mM BMIm-BF₄ and TEA were used as mobile phase additives. As it can be seen in Table 1 and taking into account that the ideal value for Tf is 1 (symmetry peak), 10 mM BMIm-BF₄ gave lower tail factors than TEA at the same concentration (significant differences were found for Trp-P-2, Trp-P-1 and AαC, compared using a *t* test, $\alpha < 0.05$). In the concentration range studied for IL (1–12 mM), Tf values were kept constant.

The change in peak efficiency observed on the HAs peaks was expressed as N/N_0 , the plate count measured with the mobile phase additive over the plate count obtained in the same conditions for the same compound

without additive. Table 1 shows the results obtained for 10 mM BMIm-BF₄ and 10 mM TEA. BMIm-BF₄ improved significantly the peak efficiencies and was much more effective than TEA at the same concentration, except for AαC (compared using a *t* test, $\alpha < 0.05$). The efficiency was improved by BMIm-BF₄, between 28% and 97% depending on the solute.

Consequently, BMIm-BF₄ seems to be more favorable than TEA as mobile phase additive for the chromatographic determination of HAs by HPLC-Fluorescence, decreasing the chromatographic retention time, improving the peak efficiencies, and providing higher peak heights.

Finally, it was interesting to select the best chromatographic conditions. This selection was focused in maximizing the chromatographic resolution of the studied amines, especially NH and H, and on the other hand minimizing the total chromatographic time. The best chromatographic condition was a gradient program explained in the experimental section.

Table 1 Tail factors and changes in peak efficiencies for all amines with the two mobile phase additives studied

	Tf±SD ^a		N/N ₀ ±SD ^a	
	10 mM TEA	10 mM BMIm-BF ₄	10 mM TEA	10 mM BMIm-BF ₄
NH	1.8±0.2	1.6±0.2	0.99±0.17	1.86±0.04
H	1.7±0.4	1.6±0.2	1.39±0.10	2.00±0.06
Trp-P-2	1.9±0.3	1.5±0.1	0.85±0.18	1.55±0.06
Trp-P-1	1.7±0.1	1.4±0.1	0.75±0.18	1.47±0.12
AαC	1.2±0.1	0.85±0.19	1.27±0.11	1.17±0.14
MeAαC	1.4±0.1	1.2±0.1	1.38±0.05	1.91±0.19

^a Mean of three values

BMIm-BF₄ as desorption solvent and memory effect suppressor in SPME–HPLC of HAs

In a previous work [17], SPME coupled with HPLC–fluorescence detection was successfully applied to determine a group of heterocyclic amines. The parameters that affect the absorption process in SPME–HPLC, absorption time, and percentage of methanol in samples were optimized. On the other hand, the desorption time was fixed to 1 min, and methanol was used as desorption solvent. In the present work, less polar amines were also analyzed, and thus, absorption time of 30 min and 2.5% of methanol in 0.05 M NaOH were chosen as optimal conditions for the absorption process.

Optimization of the desorption process: factorial designs

The most important and developed applications of ILs are related to their solvent properties. ILs have a dual nature due to its unique anion–cation composition [22], and thus, they can replace volatile organic solvents in several chemical reactions and in extraction process [1, 23]. In the present work, we introduce a novel application of BMIm-BF₄ ionic liquid as desorption solvent in SPME.

One millimolar BMIm-BF₄, 1 mM BMIm-BF₄–methanol mixture (8:2), and methanol were tested as desorption solvents with static desorption mode by injection of 0.5 mL of solvent into the desorption chamber with a glass syringe. Nine minutes was fixed for desorption time in these tests; 1 mM BMIm-BF₄ showed higher desorption efficiencies for NH and H. On the other hand, methanol showed the highest desorption efficiencies for A α C and MeA α C, the less polar amines, while Trp-P-2 and Trp-P-1 presented an intermediate behavior, showing the highest desorption efficiencies with 1 mM BMIm-BF₄/methanol (8:2). Figure 2 shows the effect of these solvents in the desorption efficiency of H, Trp-P-1, and MeA α C as representative examples. In this way, a BMIm-BF₄–methanol mixture was needed to be optimized in order to obtain the best desorption efficiencies for all the compounds.

Additionally, in the desorption process, the SPME fiber was soaked in the desorption chamber full of solvent for a fixed time (soaking time), then the valve was switched to the inject position, and the analytes were delivered to the column. Therefore, the desorption efficiencies depend not only on the desorption solvent but also on the soaking time. Given these findings, the desorption solvent composition (methanol percentage and BMIm-BF₄ concentration) and the soaking time were considered in order to obtain the optimal conditions for maximum recovery of each compound.

The optimization consisted of a two-level, three-variable, full-factorial design, 2³, where eight runs plus two replicates in the central point to evaluate the precision and

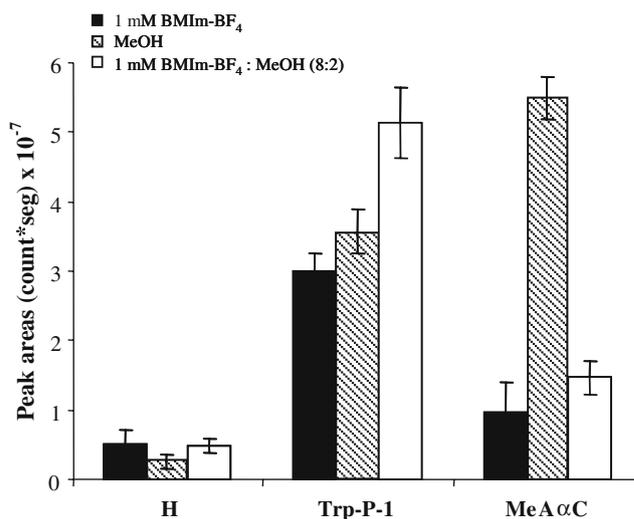


Fig. 2 Desorption efficiencies expressed as peak areas when three different desorption solvents are employed. The results are the average of three replicates

statistical validity of the results must be carried out. This design, as a first step, is very useful since with few experiments it is possible to detect the most significant variables. Minimum (–) and maximum (+) levels of each factor were chosen according to data from previous experiments: 10% and 90% methanol in the desorption solvent (factor A); 1 and 25 mM BMIm-BF₄ in the desorption solvent (factor B); and 3 and 15 min for soaking time (factor C). Peak area was chosen as response. Table 2 shows the factorial design matrix.

These results show that the six studied amines can be classified in three groups in attention to similar tendencies versus the three factors considered. A group was constituted by NH and H, Trp-P-2 and Trp-P-1 formed the second group, and the third one was constituted by A α C and MeA α C.

The effects of main factors in the response are shown in Fig. 3a; NH, Trp-P-1, and MeA α C were chosen as representative examples of each group. BMIm-BF₄ concentration in the desorption solvent had always a positive effect in response of all amines. Soaking time had a positive effect only for NH and H. On the other hand, methanol percentage had a negative effect for all amines except for A α C and MeA α C. Figure 3b shows the interaction among factors. As it can be seen, there was an interaction between BMIm-BF₄ concentration and soaking time for Trp-P-2, Trp-P-1, A α C, and MeA α C. For NH, H, Trp-P-2, and Trp-P-1, the response reached the maximum value when soaking time was at its highest level and methanol percentage at the minimum. Meanwhile, for A α C and MeA α C, the response achieved the maximum for lowest soaking time and highest methanol percentage. In all cases, BMIm-BF₄ optimal concentration was 25 mM, and for this reason, the concentration was fixed at this value for further studies.

Table 2 Factorial and Doehlert design matrices used in the optimization of the desorption process

Factorial design, 2^3				Doehlert design				
Run	[BMIm-BF ₄] (mM)	Soaking time (min)	% MeOH	Run	Coded values		Experimental values ^a	
					X_1	X_2	Soaking time (min)	% MeOH
1	25	3	90	1	0	0	12	50
2	1	3	10	2	1	0	21	50
3	13	9	50	3	0.5	0.866	16.5	84.6
4	1	15	10	4	0	0	12	50
5	1	3	90	5	-1	0	3	50
6	25	15	90	6	-0.5	-0.866	7.5	15.4
7	25	15	10	7	0.5	-0.866	16.5	15.4
8	13	9	50	8	-0.5	0.866	7.5	84.6
9	25	3	10	9	0	0	12	50
10	1	15	90					

^a The experimental values (U_i) were calculated as $U_i = U_{0i} + X_i \Delta U_i$, where U_{0i} was the centered value, X_i the coded value, and ΔU_i the range [25]

Fig. 3 Effects of the main factors (a) and interaction among factors (b) for NH, Trp-P-1, and MeA α C. Factors: *A* % methanol, *B* BMIm-BF₄ concentration (millimolars), and *C* soaking time (min). Factor levels: - minimum and + maximum

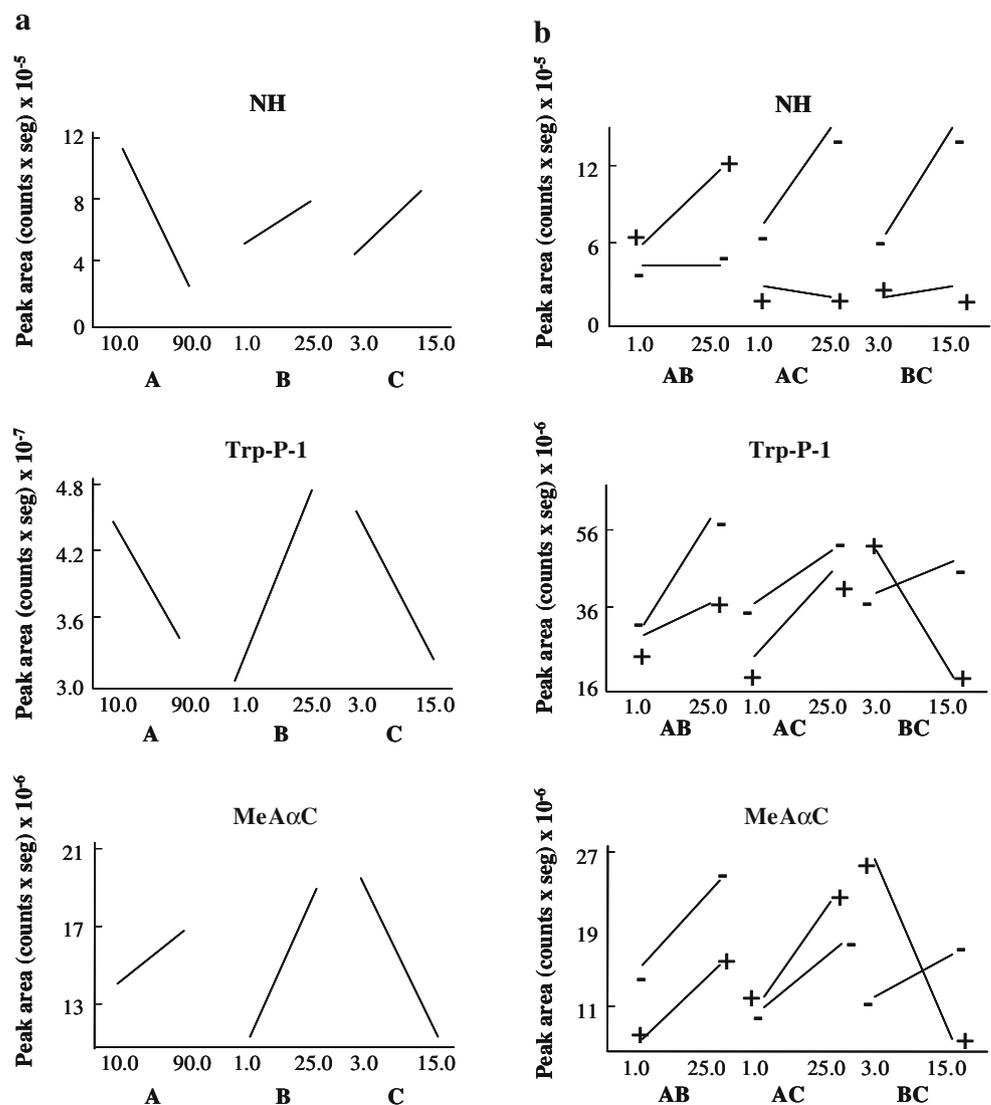


Table 3 Coefficient values of the multiple regression Eq. 1 and optimum values corresponding to each amine according to the second-degree polynomial model described

Coefficient	NH	H	Trp-P-2	Trp-P-1	A α C	MeA α C
$b_0 \times 10^{-6}$	1.36	1.29	-3.27	-9.93	-2.07	-9.66
$b_1 \times 10^{-5}$	0.136	3.05	11.7	28.0	3.30	12.0
$b_2 \times 10^{-5}$	0.294	1.44	5.35	12.4	1.15	5.83
$b_{11} \times 10^{-4}$	0.087	-0.530	-1.94	-3.62	-0.710	-1.71
$b_{22} \times 10^{-3}$	-0.394	-1.44	-3.51	-6.49	-0.731	-3.51
$b_{12} \times 10^{-3}$	-0.791	-3.99	-17.2	-50.3	-3.67	-18.5
R	99.5	98.8	87.7	85.8	82.9	81.3
$(t_{\text{soaking}})_{\text{Optimum}}$	21.0	20.8	3.0	3.0	8.06	3.0
$(\% \text{ MeOH})_{\text{Optimum}}$	16.2	21.1	67.9	83.7	58.5	75.1
Decrease in the optimum response (%)	25.7	18.0	10.9	9.42	3.67	6.10

In order to optimize the variables with significant influence, soaking time and methanol percentage in the desorption solvent, a Doehlert design was carried out. For two variables, the Doehlert design consists of one central point and six points forming a regular hexagon and therefore situated on a circle [24, 25]. To obtain more information about the system, three levels for methanol percentage and five levels for soaking time, the variable with the strongest effect, were chosen. The seven experiments required by Doehlert matrix, augmented with two central points, are shown in Table 2.

The design matrix allowed the estimation of coefficients of a second-degree polynomial model as it is indicated on the following equation:

$$R = b_0 + b_1 [t_{\text{soaking}}] + b_2 [\% \text{ MeOH}] + b_{11} [t_{\text{soaking}}]^2 + b_{22} [\% \text{ MeOH}]^2 + b_{12} [t_{\text{soaking}}] \times [\% \text{ MeOH}] \quad (1)$$

The coefficient values obtained for each amine and the optimum values for each factor are shown in Table 3. All amines showed a maximum (optimum value) that falls within the experimental domain. The maximum values for

soaking time and methanol percentage change from 3.0 to 21.0 min and 16.2% to 83.7%, respectively, as it can be seen in Table 3. The negative values for the coefficients corresponding to interaction among the factors suggest that this interaction decreases the peak areas for all compounds. Response surfaces for H and A α C are shown in Fig. 4 as representative examples.

A compromising situation was reached for the optimal soaking time and methanol percentage. NH and H presented the highest optimal soaking time and for the other amines; the average optimal time was approximately 4 min. Taking into account that NH and H presented the lowest dependence with soaking time, if we take this value as the optimal soaking time, this would implicate decreases of 17.9% and 25.1% in the responses of NH and H, respectively, because they presented the lowest dependence with this variable. Therefore, this time was adopted as best compromise for all compounds. Considering the low sensitivity of A α C, the methanol percentage was fixed at 60%. As it can be seen in Table 3, by using these conditions, the decrease in the response with respect to the optimal ones ranged between 3.67% and 25.7% for A α C and NH, respectively. NH and H presented the highest decreases in the response, but due to their sensitivity, we can assume the optimal conditions chosen.

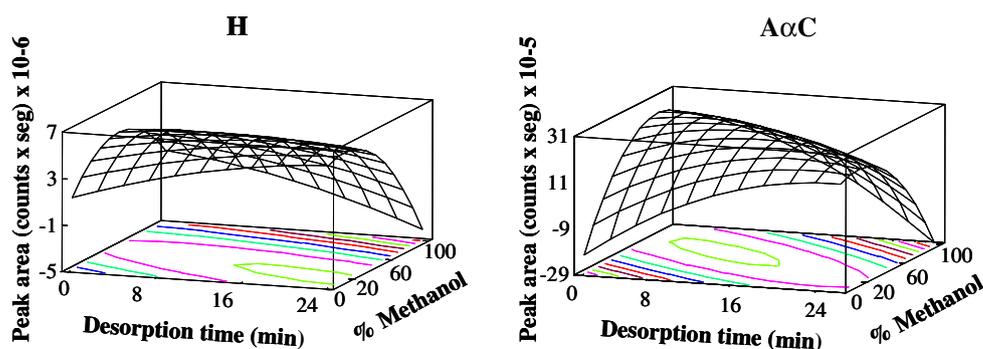
Fig. 4 Response surfaces of estimated response function from Doehlert design for H and A α C

Table 4 Memory effect expressed as percentage of initial peak area in the conditions indicated

Compound	(1)				(2)				(3)			
	Flushes											
	0	2	3	4	0	1	2	3	0	1	2	3
NH	0.616	–	–	–	9.10	–	–	–	9.10	–	–	–
H	1.24	0.644	0.571	0.418	17.7	9.20	3.60	–	17.7	–	–	–
Trp-P-2	10.2	1.42	0.633	0.323	21.7	3.36	1.02	–	21.7	2.54	1.00	–
Trp-P-1	13.2	2.19	0.473	0.246	14.0	2.26	0.887	–	14.0	0.521	–	–
A α C	2.12	0.239	0.139	0.107	–	–	–	–	–	–	–	–
MeA α C	1.95	0.483	0.384	0.220	40.7	8.31	0.707	–	40.7	3.92	0.547	–

Mean of three values

– No memory effect (< 0.1%) [19]; 1 desorption solvent/methanol, cleaning solvent/methanol, soaking time 9 min; 2 desorption solvent 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6), cleaning solvent 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6), soaking time 4 min; 3 desorption solvent 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6), cleaning solvent/methanol, soaking time 4 min

SPME memory effect

Memory effect or carry over in SPME is not of such a big concern as in many other methods because SPME is an equilibrium method. However, memory effect may become a problem when the concentration of analyte in the following sample is so low that the equilibrium concentration in the coating is lower than the concentration caused by carry over from previous analysis [26, 27]. For this reason, the memory effect should be studied in order to determine the cleaning solution composition and number of flushes needed to eliminate it.

To study the memory effect of the heterocyclic aromatic amines using CW-TPR coating, we carried out a study which consisted of cleaning by flushing the desorption chamber and SPME fiber with a mixture of 25 mM BMIm-BF₄-methanol (6:4; desorption solvent optimized in the previous section) or with methanol using 4 min as soaking time. Table 4 shows the memory effect expressed as percent of initial peak areas for each amine in the conditions indicated. The memory effect obtained with methanol as desorption and cleaning solvents previously studied [17] was included for comparative purposes. As it can be seen, when methanol was used as

desorption and cleaning solvent and employing 9 min as soaking time, more than four flushes were needed to eliminate the memory effect (<0.1%). The mixture 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6) and 4 min for soaking time gave higher memory effect, from 9% to 40%, than methanol when no clean-up was carried out. For all amines, after three flushes with methanol or BMIm-BF₄-methanol mixture, no memory effect was found. According to these results, BMIm-BF₄-methanol mixture can be a memory effect suppressor as efficient as methanol is.

Taking into account these findings, it is recommended that the fiber and the desorption chamber be cleaned by flushing three times with 250 μ L volume of 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6) to eliminate the memory effect.

Analytical performance of the SPME-HPLC method

Under optimal conditions, the analytical performance of the SPME-HPLC procedure was evaluated; 1 mM BMIm-BF₄ as mobile phase additive and a gradient elution were employed in the chromatographic separation of HAs. Table 5 shows the quality parameters of the method. The linearity was investigated over the ranges indicated in this

Table 5 Quality parameters of the analytical method

Compound	Linearity range (ng L ⁻¹) ^a	(Slope \pm SD) $\times 10^{-6}$	R	S _{y/x}	LOD (ng L ⁻¹)	RSD (%) ^b
NH	19.8–696	1.10 \pm 0.02	0.998	16,371	7.4	6.55 (198)
H	6.70–235	14.5 \pm 0.4	0.996	106,784	6.1	1.34 (67.0)
Trp-P-2	6.10–182	16.3 \pm 0.2	0.999	29,716	3.5	11.1 (61.0)
Trp-P-1	6.40–192	11.5 \pm 0.2	0.998	49,792	2.1	7.34 (64.0)
A α C	92.0–644	0.30 \pm 0.02	0.992	5,485	75	9.81 (184)
MeA α C	16.0–480	62 \pm 2.3	0.995	976,284	0.30	6.28 (160)

^a n=8

^b Run-to-run (n=3) on day-to-day (n=3) samples analyzed. Values in parentheses are the concentration values used (nanograms per liter)

for each amine. All amines showed good linearity with correlation coefficients, which varied between 0.992 and 0.999. The limits of detection of SPME–HPLC method were calculated by analyzing the replicates of a low-level standard and calculating three times their standard deviation. These limits of detection ranged from 0.3 ng L⁻¹ for MeA α C to 75 ng L⁻¹ for A α C. If we compare these results with those obtained in a previous work [17], we can see that the limits of detection using BMIm-BF₄ as mobile phase additive and a BMIm-BF₄–methanol mixture as desorption solvent were lower than those obtained with methanol as desorption solvent and TEA as mobile phase additive. In most cases, the limits of detection obtained in this work were at least ten times lower. This decrease in the limits of detection can be attributed to the conjunction of two effects. On the one hand, as it can be seen in a previous section, when only 1 mM BMIm-BF₄ was used as mobile phase additive, peak heights were higher than those obtained with 10 mM TEA as mobile phase additive. On the other hand, if this IL was used in desorption solvent composition, desorption efficiencies would be higher than those obtained when methanol was only used as desorption solvent.

To determine the inter-medium precision associated to the determination of each amine, three standard solutions with the concentrations shown in Table 5 were analyzed over three consecutive days. The obtained relative standard deviation (RSD%) values ranged between 1.34% for H and 11.1% for Trp-P-2. In addition, the variance analysis of one factor showed that there was no significant difference among the results obtained in different days for all amines, with a significant level of 0.05. These RSD (percent) values were comparable to those obtained in a previous work [17], and it should be highlighted that the concentrations employed in the present work were in all cases at least ten times inferior.

Table 6 Recovery of heterocyclic aromatic amines standards from spiked samples and their content in non-spiked samples

Compound	Average recoveries ^a of HAs in spiked samples	HAs concentration (ng g ⁻¹) in non-spiked samples
	Recovery \pm SD (%)	Concentration \pm SD (ng g ⁻¹)
NH	103.8 \pm 7.1	52.2 \pm 8.0
H	116 \pm 10	40.2 \pm 1.5
Trp-P-2	99.6 \pm 2.1	0.463 \pm 0.09
Trp-P-1	118 \pm 13	2.16 \pm 0.60
A α C	111 \pm 19	D, NQ
MeA α C	68.5 \pm 1.9	D, NQ

D detected, NQ not quantified

^a Mean of three values

Test on food sample

In order to evaluate the applicability of the proposed method, recovery studies in meat extract samples were carried out. Table 6 summarizes the average recoveries and standard deviations obtained in repeated analysis of spiked meat extracts. Recoveries have been calculated by subtracting the HAs concentrations obtained from non-spiked samples. The average recoveries were between 118.1% for Trp-P-1 and 68.51% for MeA α C.

Finally, the method was applied to HAs determination in meat extract samples without spiking. Table 6 shows the levels of some amines in the analyzed samples. Higher values were obtained for NH and H, 52.25 and 40.24 ng g⁻¹, respectively. The other HAs contents were 0.463 and 2.159 ng g⁻¹ for Trp-P-2 and Trp-P-1, respectively. These results are concordant with other authors [28, 29] and a previous work [17]. Totsuka et al. [30] confirmed that NH and H are also found at high amounts in cooked samples. Figure 5 shows a chromatogram of the non-spiked sample and a chromatogram of a standard solution with comparative purposes. As it can be seen, there was a coelution of A α C and some unknown compounds. For these reasons, A α C cannot be quantified. MeA α C was detected but not quantified.

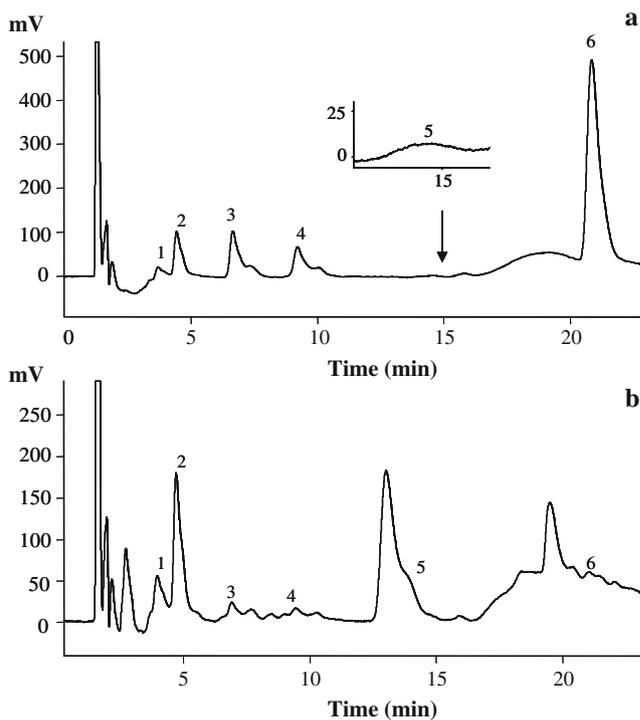


Fig. 5 Chromatogram of a standard solution (a) and a non-spiked meat extract sample (b) extracted according to the optimal conditions indicated in the text. HAs: 1 NH, 2 H, 3 Trp-P-2, 4 Trp-P-1, 5 A α C, and 6 MeA α C

Conclusions

The beneficial effects of BMIm-BF₄ IL as additive in the mobile phase of HPLC-fluorescence method for the determination of a group of HAs have been described. This IL was found to be more favorable than the common additive, TEA, as mobile phase additive and resulted in an enhancement of peak efficiencies as well as peak shapes (areas, heights, widths, and tails).

The important property of this IL as solvent encouraged us to introduce BMIm-BF₄ as desorption solvent in SPME of HAs. A complete optimization of the desorption process involving two experimental designs was carried out. A BMIm-BF₄-methanol mixture was found to be the optimal desorption solvent composition, and moreover, a lower soaking time than when methanol was used as desorption solvent was required. Memory effect was also studied, and 25 mM BMIm-BF₄/methanol (4:6) resulted in a memory effect suppressor as adequate as methanol.

The limits of detection obtained under the optimal conditions of the SPME-HPLC method were ranged between 0.3 and 75 ng L⁻¹. In most cases, these limits of detection were at least ten times lower than those obtained when TEA was used as mobile phase additive. This decrease in the limits of detection can be attributed to the use of BMIm-BF₄ as mobile phase additive and in the desorption solvent composition. Finally, the optimized method has been successfully applied to the determination of HAs contained in commercial meat extracts.

Acknowledgments A. Martín-Calero thanks the Consejería de Industria del Gobierno de Canarias for her contract, reference ID-TF-07/074. This work was supported by the projects CTQ2007-67084/BQU and CTQ2008-06253/BQU financed by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

References

1. Poole CF (2004) *J Chromatogr A* 1037:49–82
2. Liu JF, Jönsson JA, Jiang GB (2005) *Trends Anal Chem* 24:20–26
3. Han X, Armstrong DW (2007) *Acc Chem Res* 40:1079–1086
4. Baker GA, Baker SN, Pandley S, Bright FV (2005) *Analyst* 130:800–808
5. Liu JF, Li N, Jiang GB, Liu JM, Jönsson JA, Wen MJ (2005) *J Chromatogr A* 1066:27–32
6. Polyakova Y, Koo YM, Row KH (2006) *Biotechnol Bioprocess Eng* 11:1–6
7. Berthod A, Ruiz-Ángel MJ, Carda-Broch S (2007) *J Chromatogr A* 1184:6–18
8. Buszewski B, Studzińska S (2008) *Chromatographia* 68(1–2):1–10
9. He L, Zhang W, Zhao L, Liu X, Jiang S (2003) *J Chromatogr A* 1007:39–45
10. Zhang WZ, He LJ, Gu YL, Liu X, Jiang SX (2003) *Anal Lett* 36(4):827–838
11. Xiaohua X, Liang Z, Xia L, Shengxiang J (2004) *Anal Chim Acta* 519:207–211
12. Tang F, Tao L, Luo X, Ding L, Guo M, Nie L, Yao S (2006) *J Chromatogr A* 1125(2):182–188
13. Nagao M, Ushijima T, Watanabe N, Okochi E, Ochiai M, Nakagama H, Sugimura T (2002) *Environ Mol Mutagen* 39(2–3):158–164
14. Sanz-Alaejos M, González V, Afonso AM (2008) *Food Addit Contam* 25:2–24
15. Turesky RJ (2007) *Toxicol Lett* 168(3):219–227
16. Barceló-Barrachina E, Moyano E, Puignou L, Galcerán MT (2004) *J Chromatogr B* 802(1):45–59
17. Martín-Calero A, Ayala JH, González V, Afonso AM (2007) *Anal Chim Acta* 582:259–266
18. Chen J, Pawliszyn J (1995) *Anal Chem* 67:2530–2533
19. Lord HL (2007) *J Chromatogr A* 1152(1–2):2–13
20. Martín-Calero A, Pino V, Ayala JH, González V, Afonso AM (2007) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 30:27–42
21. Ruiz-Angel MJ, Carda-Broch S, Berthod A (2006) *J Chromatogr A* 1119:202–208
22. Berthod A, Ruiz-Angel MJ, Huguet S (2005) *Anal Chem* 77:4071–4080
23. Carda-Broch S, Berthod A, Armstrong DW (2003) *Anal Bioanal Chem* 375:191–199
24. Dagnac T, Padró A, Rubio R, Rauret G (1998) *Anal Chim Acta* 364:19–30
25. Ferreira SLC, dos Santos WNL, Becerra MA, Lemos VA, Bosques-Sendra JM (2003) *Anal Bioanal Chem* 375:443–449
26. Gorechi J, Pawliszyn J (1995) *Anal Chem* 67:3265–3274
27. Chang W, Sung Y, Huang S (2003) *Anal Chim Acta* 495:109–122
28. Toribio F, Moyano E, Puignou L, Galcerán MT (2000) *J Chromatogr A* 880:101–112
29. Toribio F, Moyano E, Puignou L, Galcerán MT (2002) *J Chromatogr A* 948:267–281
30. Totsuba Y, Ushiyama H, Ishihara J, Sinha R, Goto S, Sugimura T, Wakabayashi K (1999) *Cancer Lett* 143:139–143