

2. ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA

2.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

De todas las etapas que componen el proceso de análisis uno de los más críticos es sin duda el tratamiento de la muestra. En el caso de tener muestras sólidas, como por ejemplo un alimento, el proceso de tratamiento de muestra se puede generalizar de la siguiente manera. En primer lugar, la muestra debe ser homogeneizada para permitir una toma de muestra representativa y para aumentar el área superficial, lo que facilita la extracción de los analitos. Con frecuencia es necesario, a fin de facilitar la trituración y dispersión de la muestra, adicionar un disolvente que normalmente es agua. Una de las maneras de realizar la extracción de los analitos consiste en dispersar la matriz sobre una fase sólida (MSPD) que en general es un adsorbente de los normalmente utilizados en extracción en fase sólida (SPE) (Barker, 2000). A continuación, los analitos son aislados de la matriz, lo que se lleva a cabo extrayéndolos con un fluido adecuado que en general es un disolvente inmiscible con agua. Normalmente, una vez se ha conseguido que los compuestos de interés se encuentren en disolución, es necesario realizar un proceso de limpieza que permita eliminar el mayor número de interferencias posible. Con este fin, se pueden emplear diferentes técnicas, como por ejemplo la extracción líquido-líquido (LLE) o la extracción en fase sólida (SPE). Finalmente, se lleva a cabo una concentración del extracto obtenido y/o un cambio del disolvente para adecuar la disolución a inyectar al sistema de análisis que se pretende utilizar.

El objetivo de este capítulo es el establecimiento de un procedimiento de extracción de las HAs en muestras de alimentos así como su preconcentración y limpieza (*clean-up*). Como se ha indicado en la introducción de esta memoria (Apartado 1.2.1), en la literatura se encuentran descritos diversos procedimientos, pero o bien no permiten analizar todas las HAs normalmente encontradas en alimentos o bien son largos y tediosos. Por ello, nosotros hemos evaluado el uso de dos de las técnicas de tratamiento de muestra comunmente aplicadas al análisis de diferentes componentes en matrices alimentarias. En primer lugar, en el Apartado 2.2 hemos profundizado en el estudio de la aplicabilidad de la SPE para purificar las HAs con la finalidad de simplificar el método utilizado normalmente en nuestro laboratorio (Galceran *et al.*, 1996). A continuación, en el Apartado 2.3 hemos evaluado el uso de la extracción con fluidos supercríticos (SFE).

2.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Como se ha comentado anteriormente, la preparación de muestra es uno de los aspectos críticos en el proceso analítico, sobretodo si se pretenden determinar componentes traza en muestras complejas. La introducción del uso de adsorbentes comerciales para extraer y purificar los analitos en disolución supuso un gran paso, ya que la utilización de esta técnica permite aislar, purificar y preconcentrar con éxito compuestos químicos de manera rápida y reproducible. Además, la extracción en fase sólida (SPE) no sólo evita las molestas emulsiones que se generan en muchos de los procesos de extracción líquido-líquido, sino que también reduce considerablemente el uso de disolventes orgánicos.

Desde que se realizó la primera aplicación de la SPE en los años 50, la expansión de esta técnica ha sido imparable, llegando a ser hoy en día una de las más utilizadas en multitud de análisis, incluido el de alimentos. Este hecho ha sido favorecido por la adaptación del mercado a las necesidades de los analistas, ya que se han sintetizado nuevos formatos que incluso han permitido la automatización del proceso y se han creado nuevos adsorbentes que incrementan tanto la selectividad de la extracción como las posibles aplicaciones (Hennion, 1999).

2.2.1. Introducción y objetivos

Los procedimientos de purificación por extracción en fase sólida (SPE) se basan en el uso de dispositivos comerciales que contienen entre 50 y 1000 mg de un sólido poroso particulado. Cuando la disolución que contiene los analitos pasa a través del adsorbente activado, se produce una retención de éstos en la superficie del sólido. Seguidamente se realiza una etapa de lavado con la que se pretende desorber las interferencias que hayan podido quedar retenidas. Finalmente, los compuestos de interés se eluyen mediante el paso del volumen necesario de una disolución adecuada.

La naturaleza química de los materiales empleados en SPE es similar a la de los utilizados en LC. Es por ello que el proceso de extracción en fase sólida se puede considerar como una cromatografía de baja resolución llevada a cabo en dos situaciones extremas: retención máxima de los analitos durante el paso de la muestra y retención mínima durante la elución.

El formato más común en el que se encuentran los dispositivos comercializados para aplicar la SPE se introdujo a finales de los años 70, y consiste en columnas fabricadas principalmente en polipropileno. El adsorbente se mantiene fijo gracias a dos fritados que normalmente son partículas de polipropileno sinterizadas. El tamaño de las partículas, entre 40 y 60 μm de diámetro, es tal que permite el paso de líquidos con una ligera succión. Este formato presenta sin embargo ciertos problemas si el volumen de muestra es elevado o si contiene partículas en suspensión. Para solventar estos inconvenientes, a principios de los años 90 se introdujo la utilización de discos, de aproximadamente 0,5 mm de grosor y entre 4 y 96 mm de diámetro (Markell *et al.*, 1991). La demanda de dispositivos que permitan el análisis simultáneo de un elevado número de muestras originaron en 1997 el diseño del formato de 96 pocitos (Wells, 1999). Cada uno de ellos contiene un pequeño disco o un minicartucho, con menos de 50 mg de material adsorbente. Por lo tanto, el volumen de eluyente es mínimo, entre 100 y 200 μl de disolvente. Otro formato de pequeño tamaño es la microfibra de microextracción en fase sólida (SPME), desarrollada por Pawliszyn en 1990 (Arthur *et al.*, 1990). Este dispositivo consiste en una fibra sobre la cual se dispone el adsorbente. Tras sumergirla en el líquido y alcanzar el equilibrio, los analitos se desorben en un pequeño volumen de disolvente o bien directamente en el inyector del cromatógrafo de gases. La SPME se ha empleado principalmente para analizar compuestos volátiles en diferentes alimentos (Elmore *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2001).

Una posibilidad interesante que ofrece la SPE es la de llevar a cabo el proceso de extracción en línea con el de análisis mediante LC, lo que se consigue utilizando precolumnas. De esta manera no es necesario manipular la muestra para su inyección, lo que reduce las posibilidades de contaminación y pérdidas producidas por las transferencias. En la literatura se puede encontrar una reciente publicación que recoge algunas de las aplicaciones de este tipo de extracción en alimentos (Bovanova *et al.*, 2000).

Tipos de adsorbentes

La selectividad de una extracción está relacionada con la capacidad del adsorbente de discriminar entre los analitos de interés y los otros compuestos de la matriz. Por lo tanto, es función entre otros de la estructura química del analito, las propiedades del adsorbente y/o la composición de la matriz de la muestra. Por tanto, la selectividad puede ser optimizada mediante la elección de la fase estacionaria más adecuada.

Los materiales utilizados en SPE tienen en común una estructura tridimensional rígida y porosa, con una elevada área superficial. Los más comunmente utilizados son

sílice o resinas poliméricas, los cuales pueden modificarse mediante la introducción de diferentes grupos funcionales. También existen los denominados adsorbentes de acceso restringido (RAM), que permiten únicamente el paso de moléculas pequeñas. Además, en los últimos años se han introducido en el mercado otro tipo de adsorbentes que permiten una elevada selectividad en la extracción. Estos materiales, basados en el reconocimiento molecular, consisten en anticuerpos inmovilizados y en polímeros de huella molecular.

En el caso del análisis de alimentos, se han utilizado tradicionalmente los adsorbentes de base sílice. Este tipo de adsorbente consiste en gel de sílice, el cual puede modificarse mediante la unión covalente a los grupos silanol de diferentes grupos funcionales, bien de naturaleza polar, apolar, iónica o mixta (apolar + iónica). Dependiendo por tanto de la funcionalidad del adsorbente, los mecanismos de retención son distintos. Además, la existencia de grupos silanoles residuales origina las denominadas interacciones secundarias, que pueden afectar el proceso de extracción. Entre las aplicaciones descritas en la literatura, podemos encontrar el uso de adsorbentes de base sílice para purificar las HAs. Por ejemplo, se ha descrito el uso de cartuchos C18, PRS o SCX para determinar estos analitos en alimentos cocinados. Tal y como se comenta en la siguiente sección de este apartado, en la mayoría de estos trabajos, se han realizado etapas consecutivas de SPE combinando el uso de varios adsorbentes.

La introducción de los adsorbentes poliméricos no sólo solventó el problema de las interacciones secundarias provocadas por los silanoles libres de la sílice, sino que además permitió ampliar el intervalo de pH de trabajo. El polímero introducido por primera vez en el campo del tratamiento de muestra consistió en poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) altamente entrecruzado. La elevada hidrofobicidad de este copolímero hacía imprescindible una etapa de acondicionamiento y un control riguroso para evitar su secado. La introducción de grupos polares (hidroxilo, acetilo, etcétera) que permiten aumentar el carácter hidrofílico del polímero así como la utilización de copolímeros de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona han permitido eliminar la etapa de acondicionamiento (Bouvier *et al.*, 1997). En el caso del análisis de HAs en alimentos, los adsorbentes poliméricos han sido utilizados en alguna ocasión, por ejemplo para su determinación en un extracto de carne (Vollenbroeker *et al.*, 2000) o en leche (De Bruin *et al.*, 2001).

El interés por simplificar el proceso de tratamiento de muestra estimuló la investigación de adsorbentes altamente específicos que permitieran realizar los procesos de extracción, limpieza y preconcentración en un solo paso. Esto se consiguió por primera vez

utilizando inmunoabsorbentes, consistentes en anticuerpos unidos covalentemente a un soporte adecuado. En el caso de las HAs, la purificación por inmunoafinidad ha sido únicamente descrita para analizar estos analitos en orina (Dragsted *et al.*, 1995; Stillwell *et al.*, 1997). Por otra parte, los polímeros de huella molecular (MIPs), también conocidos como anticuerpos artificiales, tan sólo se han utilizado para analizar HAs en un trabajo en el que se describe el análisis de estos compuestos en heces y orina de rata (Frandsen *et al.*, 2002).

Análisis de HAs en alimentos: métodos basados en la SPE

Como se expuso en el Capítulo 1 de esta memoria, en la bibliografía se pueden encontrar numerosas metodologías de tratamiento de muestra para el análisis de HAs en alimentos. Generalmente, el proceso comienza con una trituración del alimento tras adicionar una disolución acuosa que ayuda a la homogeneización. Tras extraer los analitos con la ayuda de un disolvente orgánico, a continuación se lleva a cabo una etapa de purificación, para lo cual frecuentemente se utilizan uno o más cartuchos de extracción en fase sólida.

Hoy en día, los métodos de tratamiento de muestra más frecuentemente utilizados para analizar HAs en alimentos consisten en modificaciones del procedimiento introducido en 1990 por Gian Gross (Gross, 1990). Este procedimiento se inicia con una homogeneización en medio alcalino de la muestra. A continuación, se lleva a cabo una extracción líquido-líquido con diclorometano, utilizando tierra de diatomeas como soporte de la fase acuosa. El disolvente orgánico se transfiere a un cartucho de propilbencensulfonato sódico (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 octadecilsilano (C18) acoplado en línea mediante el paso de acetato de amonio a pH 8. Finalmente, se eluyen las HAs con una mezcla MeOH/NH₃. Debido a la ausencia de etapas de transferencia, este método tándem se presentó como un posible método estándar que permitía el análisis de múltiples muestras. Numerosos autores dirigieron sus esfuerzos a la optimización del proceso, con el objetivo de aumentar tanto la selectividad como la recuperación de los analitos. Para ello, se realizaron principalmente modificaciones en las disoluciones de lavado y de elución (Galceran *et al.*, 1993; Arvidsson *et al.*, 1997; Knize *et al.*, 1998). En otros casos, se recogieron los lavados provenientes del intercambiador catiónico para analizar los analitos menos polares (Gross

et al., 1992; Galceran *et al.*, 1996). Si la complejidad de la muestra era elevada, algunos autores optaron por introducir etapas adicionales de purificación con diferentes adsorbentes (Perfetti, 1996; Solyakov *et al.*, 1999). En la Figura 2.1 se muestra de forma generalizada el esquema de los métodos de tratamiento de muestra basados en el acoplamiento LLE(tierra de diatomeas)-SPE(PRS)-SPE(C18).

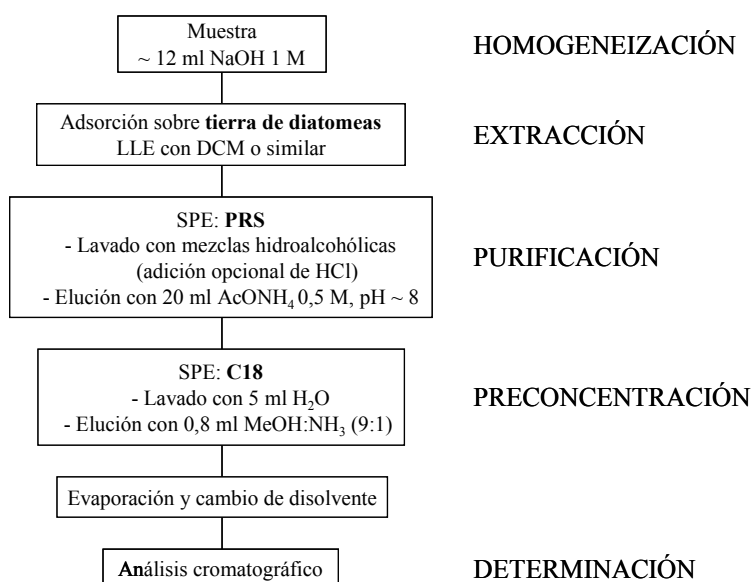


Figura 2.1.- Esquema general de los métodos de tratamiento de muestra basados en el acoplamiento LLE(tierra de diatomeas)-SPE(PRS)-SPE(C18).

En el año 1996, ocho laboratorios europeos con experiencia en el análisis de HAS iniciaron un programa con el que se pretendía demostrar la validez de la metodología analítica desarrollada hasta el momento (De Meester, 1998). Se realizó en primer lugar un ejercicio interlaboratorio en el cual se pidió a los diferentes laboratorios participantes que determinasen el contenido de IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx y PhIP en una disolución metanólica. Aunque los métodos de determinación fueron diferentes para cada laboratorio, este primer ejercicio reveló que no existían discrepancias entre los resultados obtenidos por los diferentes participantes. Además, la desviación estándar relativa (RSD %) tanto dentro de cada laboratorio como entre laboratorios en general no superó el 10 %. El siguiente ejercicio interlaboratorio consistió en el análisis de las mismas HAS pero esta vez en un extracto de carne liofilizado cuya preparación se describió en la Tesis Doctoral de P. Pais (Pais, 1996). El tratamiento de muestra aplicado por todos los participantes consistió en el método de G. Gross, y algunos laboratorios optaron por utilizar alternativamente algún otro

método. La realización de este segundo ejercicio interlaboratorio puso de manifiesto una elevada variabilidad de los resultados, no únicamente entre laboratorios sino también dentro de un mismo laboratorio.

Así, el primer objetivo concreto planteado en la presente tesis doctoral consistió en estudiar diversos procedimientos de tratamiento de muestra para analizar HAs con el fin de identificar las posibles fuentes de variabilidad de cada método. De esta manera sería posible establecer una metodología de tratamiento de muestra adecuada.

El trabajo experimental se inició con la optimización de la separación de los compuestos mediante cromatografía de líquidos, realizando la detección e identificación de los analitos mediante un detector ultravioleta con diodos en serie. El desarrollo de esta parte del trabajo se encuentra descrito en la primera parte del Apartado 2.2.2.1 del presente capítulo.

A continuación, se eligieron los métodos de tratamiento de muestra a estudiar. El primero de ellos consistió en el propuesto por G. Gross. El segundo método fue el publicado inicialmente por G. Gross y su colaborador A. Grüter en 1992 (Gross *et al.*, 1992) y mejorado posteriormente por nuestro grupo de investigación (Galceran *et al.*, 1996). Este método se basa en la recolección de los lavados procedentes del cartucho de intercambio iónico con el fin de determinar las HAs menos polares. Se eligió también para ser incluido en el estudio uno de los métodos alternativos utilizados en el ejercicio interlaboratorio (Perfetti, 1996), ya que había mostrado una mejoría en la selectividad del proceso de purificación mediante la incorporación de un etapa adicional de purificación. Estos métodos se encuentran descritos en mayor detalle en la Tabla 2.1. Además, nos propusimos estudiar un método equivalente al método de un sólo extracto propuesto por G. Gross pero sustituyendo los lavados ácidos del cartucho PRS por mezclas hidroalcohólicas. Este método se ha designado como Método 4 en la Tabla 2.1. Tras estudiar los porcentajes de recuperación de los analitos al tratar disoluciones metanólicas, propusimos la inclusión en el estudio de un nuevo método en el cual el propilsulfonato sódico se preacondicionaba con ácido (Método 5 de la Tabla 2.1).

Una vez establecidos los diferentes porcentajes de recuperación de los analitos para disoluciones metanólicas, se utilizó un extracto de carne de vacuno liofilizado (Pais, 1996) para comprobar la aplicabilidad a muestras reales de los métodos estudiados. Tanto en el caso del estudio de recuperaciones con disoluciones como en el del análisis del extracto de carne, la cuantificación se realizó utilizando el método de la adición estándar. Los

resultados obtenidos en el estudio se incluyen en la segunda parte del Apartado 2.2.2.1 y en el Apartado 2.2.2.2 del presente capítulo. Este último apartado consiste en una comunicación científica (Artículo II), la cual lleva por título "*Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract*".

Por otro lado, tomando como referencia el nuevo método desarrollado basado en el preacondicionamiento ácido del cartucho PRS, se estudiaron los cambios cualitativos y cuantitativos derivados de la utilización de diferentes marcas comerciales o estructuras de los adsorbentes empleados. En este caso, además de la determinación LC-UV, se utilizó el acoplamiento LC-MS cuya optimización se describe en el Capítulo 3 de la presente memoria. Los resultados obtenidos se recogen en el Apartado 2.2.2.3, el cual incluye el Artículo III titulado "*Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract*".

Tabla 2.1.- Diferentes etapas de los métodos de tratamiento de muestra estudiados.

		Método 1 (Gross, 1990)	Método 2 (Gross <i>et al.</i> , 1992) (Galceran <i>et al.</i> , 1996)		Método 3 (Perfetti, 1996)	Método 4	Método 5
Homog.		NaOH/ T.diat.	NaOH/ T.diat.		NaOH/ T.diat.	NaOH/ T.diat.	NaOH/ T.diat.
Extrac.		DCM	DCM		DCM	DCM	DCM
SPE 1	adsorb.	PRS	PRS		PRS	PRS	PRS
	acond.	DCM	DCM		DCM	DCM	HCl/H ₂ O/ MeOH/DCM
	lavado	HCl/MeOH /H ₂ O	-		HCl/MeOH /H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
	elución	AcONH ₄ pH 8	HCl/MeOH/ H ₂ O	AcONH ₄ pH 8	AcONH ₄ pH 8	AcONH ₄ pH 8	AcONH ₄ pH 8
SPE 2	adsorb.	C18	C18	C18	C18	C18	C18
	acond.	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O	MeOH/H ₂ O
	lavado	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O
	elución	MeOH/NH ₃	MeOH/NH ₃	MeOH/NH ₃	MeOH/NH ₃	MeOH/NH ₃	MeOH/NH ₃
SPE 3	adsorb.	-	-	-	SCX	-	-
	acond.	-	-	-	H ₂ O/MeOH /K ₂ HPO ₄	-	-
	lavado	-	-	-	MeOH/ K ₂ HPO ₄ /H ₂ O	-	-
	elución	-	-	-	MeOH/ AcONH ₄ pH 8	-	-

2.2.2. Trabajo experimental

2.2.2.1. Estudio preliminar

Cromatografía de líquidos

En una primera fase del trabajo pusimos a punto un método para la determinación de HAs. Tal y como se expuso en la introducción de la memoria, la cromatografía de líquidos es la técnica de separación más ampliamente utilizada para el análisis de las aminas heterocíclicas. Por ello, esta técnica ha sido escogida en nuestro trabajo para separar las HAs, empleando para ello un sistema de dos bombas con un mezclador de alta presión y un módulo controlador (Pharmacia LKB 2150-2152, Uppsala, Suecia). Como sistema de detección se escogió la absorción UV utilizando un detector de diodos en serie (DAD) (Beckman System Gold 168, Fullerton, CA), ya que es un detector sencillo y permite la confirmación del pico cromatográfico mediante la comparación de su espectro UV con el correspondiente a un estándar.

Las condiciones cromatográficas más utilizadas para la separación de las aminas aromáticas heterocíclicas son las propuestas por Gross y Grüter (Gross *et al.*, 1992). Estos autores emplean una columna de 25 cm de largo, 4,6 mm de diámetro interno y rellena de partículas de 5 μm de diámetro, consistentes en sílice con grupos funcionales octadecilo unidos y un tratamiento especial de desactivación para bases (TSKgel ODS 80TM). La separación se produce mediante un gradiente ternario basado en dos tampones de fosfato de trietilamina a diferente pH (A: pH 3,2; B: pH 3,6) y acetonitrilo (C) como modificador orgánico. Se requieren dos fases móviles acuosas debido a que a pH 3,2 coeluyen la Trp-P-2 y la PhIP y a pH 3,6 lo hacen la MeIQ y la Glu-P-1. El gradiente sugerido es el siguiente, manteniendo el flujo a 1 ml/min: 5-15 % C en A, 0-10 min; cambio A por B, 10-10,1 min; 15-25 % C en B, 10,1-20 min; 25-55 % C en B, 20-30 min. El volumen de inyección propuesto es de 15 μl .

Sin embargo, la instrumentación disponible en nuestro laboratorio únicamente permitía la utilización de dos fases móviles, por lo que se buscó una posible alternativa estudiando el sistema propuesto por Gross (Gross, 1990). En este caso, se utilizaba fosfato de trietilamina a pH 3,3 (A), y acetonitrilo (B). El gradiente propuesto era: 5-25% B en A, 0-20 min; 25-55 % B en A, 20-30 min, manteniendo el flujo a 1 ml min^{-1} . De esta manera, Gross consiguió la separación de once compuestos, entre los que no se encontraban Trp-P-

1 y Trp-P-2. Sin embargo, al aplicar dicho gradiente al conjunto de los patrones incluidos en este trabajo, se observó que la Trp-P-2 y la PhIP no se conseguían separar. Por este motivo, se estudiaron diferentes modificaciones, tanto del pH como de la programación del gradiente. Finalmente, se llegó a la conclusión de que el pH óptimo era 3,3, y se propuso el siguiente gradiente: 5-23 % B en A, 0-18 min; 23 % B en A, 18-25 min; 23-55 % B en A, 25-33 min. En la Figura 2.2 se muestra el cromatograma obtenido a 263 nm en estas condiciones, donde puede observarse una aceptable separación entre todos los compuestos.

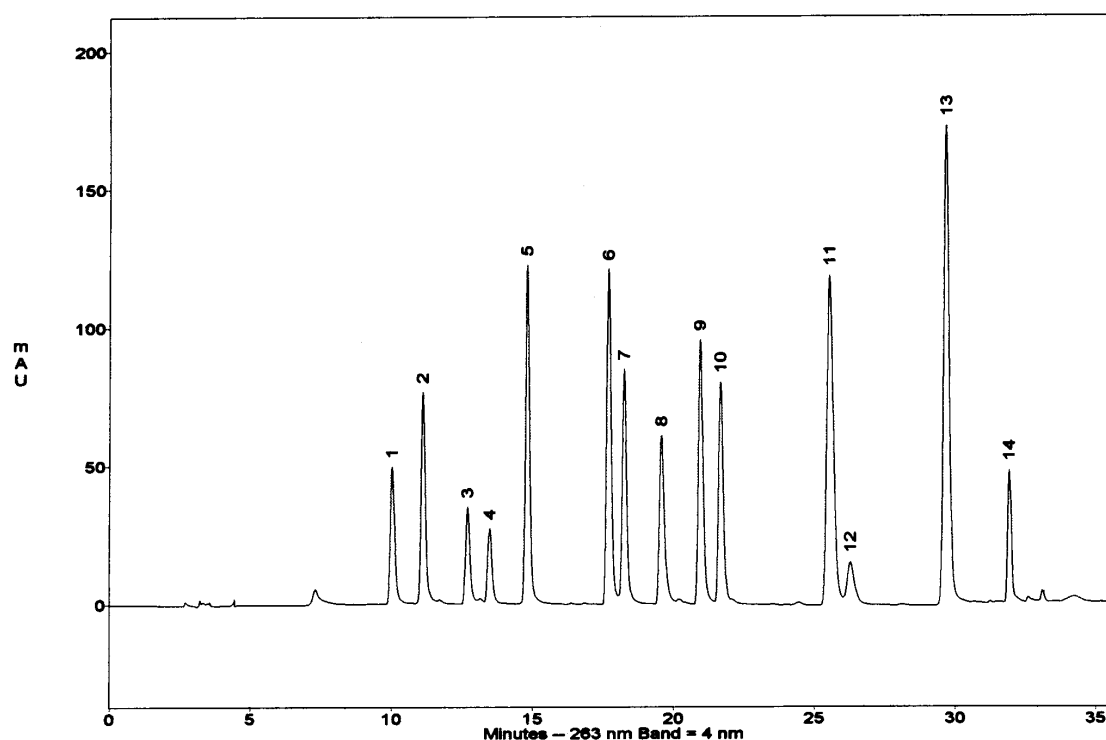


Figura 2.2.- Cromatograma de una mezcla de patrones ($\sim 2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Condiciones experimentales: elución por gradiente en fase invertida utilizando mezclas fosfato de trietilamina pH 3,3/acetonitrilo y una columna C_{18} . El volumen de inyección es de $15 \mu\text{L}$. Picos: 1. Glu-P-2; 2. IQ; 3. MeIQ; 4. Glu-P-1; 5. MeIQx; 6. 7,8-DiMeIQx; 7. 4,8-DiMeIQx; 8. Norharman; 9. TriMeIQx (PI); 10. Harman; 11. Trp-P-2; 12. PhIP; 13. Trp-P-1; 14. A α C.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas óptimas, se estudiaron varios parámetros de calidad. En primer lugar, se estimaron los límites de detección (LODs) como la cantidad de analito inyectada que da una señal igual a tres veces el ruido de fondo del cromatograma. Los valores obtenidos al inyectar $15 \mu\text{L}$ de disolución metanólica, indicados en la Tabla 2.2, son comparables a los descritos en la bibliografía para la detección UV.

Tabla 2.2.- Límites de detección de las aminas heterocíclicas (ng inyectados).

Analito	LOD (ng inyectados)
Glu-P-2	1,3
IQ	1,4
MeIQ	1,3
Glu-P-1	1,5
MeIQx	0,2
7,8-DiMeIQx	0,2
4,8-DiMeIQx	0,2
Norharman	0,9
Harman	0,8
Trp-P-2	0,2
PhIP	1,5
Trp-P-1	0,2
A α C	0,8

A continuación, se comprobó la respuesta lineal de todos los analitos en el intervalo de trabajo. En todos los casos, se inyectaron 15 μ l de cinco disoluciones con concentraciones comprendidas entre 0,303 y 10,2 μ g ml⁻¹, y se utilizó la TriMeIQx como patrón interno a una concentración de 1,94 μ g ml⁻¹. Todas las funciones de calibrado obtenidas fueron ajustadas a rectas con coeficientes de regresión superiores a 0,999.

El siguiente parámetro estudiado correspondió a la precisión, expresada a corto y medio plazo. La repetitividad o precisión *run-to-run* se define como la desviación estándar relativa de un determinado número de medidas realizadas en las mismas condiciones y en un mismo día. Para su determinación, se inyectaron cinco veces 15 μ l de una disolución patrón que contenía todos los analitos a una concentración aproximada de 1,4 μ g ml⁻¹. Se calculó la repetitividad de los tiempos de retención y de la relación de áreas entre los analitos y el patrón interno, para minimizar las desviaciones debidas a la inyección manual. Los resultados obtenidos, indicados en la Tabla 2.3, no superaron en ningún caso el 9,4 % para la relación de áreas y el 1,3 % para el tiempo de retención.

De manera similar, la precisión a medio plazo o *day-to-day* se define como la desviación estándar relativa de una serie de medidas realizadas en diferentes días. Para su determinación se inyectaron 15 μ l de una disolución de las HAs cinco días diferentes a un nivel de concentración de \sim 1,4 μ g ml⁻¹. Se calculó la variabilidad de los tiempos de retención y de la relación entre las áreas de los analitos y la del patrón interno, para solventar desviaciones debidas a la inyección manual. Los resultados obtenidos, incluidos

también en la Tabla 2.3, fueron en todo caso inferiores a 9,7 % para la relación de áreas y 1,5 para el tiempo de retención.

Tabla 2.3.- Repetitividad y precisión a medio plazo (RSD %, n=5) del sistema cromatográfico.

Analito	Relación de áreas		Tiempo de retención	
	<i>run-to-run</i>	<i>day-to-day</i>	<i>run-to-run</i>	<i>day-to-day</i>
Glu-P-2	2,4	2,4	1,2	1,5
IQ	1,8	1,9	1,1	1,3
MeIQ	8,1	9,7	1,1	1,3
Glu-P-1	8,8	9,7	0,88	1,0
MeIQx	1,5	1,6	0,87	1,0
7,8-DiMeIQx	1,2	1,2	0,61	0,72
4,8-DiMeIQx	1,6	1,7	0,64	0,75
Norharman	6,7	6,6	0,90	1,0
Harman	9,4	9,1	0,85	0,98
Trp-P-2	3,0	3,5	1,1	1,2
PhIP	1,1	1,5	0,96	1,1
Trp-P-1	1,5	1,8	1,3	1,5
A α C	4,4	4,4	0,25	0,25

Comparando los valores de precisión a corto y medio plazo se puede observar que los valores obtenidos al trabajar en diferentes días son ligeramente superiores. Se observa además que generalmente los compuestos con menor área (MeIQ, Glu-P-1, Harman, Norharman, A α C, ver Figura 2.2) son los que tienen una mayor desviación estándar en su relación de áreas.

Retención en el intercambiador catiónico

En el procedimiento de extracción y purificación de los extractos propuesto por Gross, la etapa de intercambio catiónico efectuada con el cartucho de propilsulfonato sódico (PRS) es la más crítica del proceso. Dado que las aminas se encuentran en forma neutra y que el disolvente utilizado para transferir los analitos de la tierra de diatomeas al cartucho de SPE es apolar, tan solo pueden quedar retenidas en la resina de intercambio iónico por fuerzas de interacción secundarias apolares. Al activar posteriormente el proceso de intercambio catiónico mediante el paso de disoluciones hidroalcohólicas ácidas, las aminas que tienen menos tendencia a protonarse no son retenidas en el cartucho PRS y se eluyen en las disoluciones de lavado. Por ello, en el método de dos extractos propuesto por Gross (Gross *et al.*, 1992) se recogen estas disoluciones y se procede a un posterior tratamiento para analizar las HAs menos polares. En este estudio previo y para conocer

hasta que punto era necesario activar el intercambiador iónico, nos propusimos investigar el efecto de la sustitución de los lavados ácidos del adsorbente por lavados neutros con diferentes mezclas MeOH:H₂O (2:8, 4:6, 5:5, 6:4, v:v). A fin de llevar a cabo este estudio, se procedió en primer lugar a estudiar las recuperaciones de las HAs al tratar disoluciones metanólicas. Así, estas disoluciones se adicionaron al hidróxido de sodio, y a continuación se realizó la mezcla con la tierra de diatomeas utilizada como soporte en el proceso de LLE. Tras transferir las HAs al cartucho PRS, éste se lavó con las diferentes disoluciones de lavado a estudiar, y seguidamente las HAs se eluyeron al cartucho C18.

Como se puede apreciar en la Figura 2.3, donde se muestran las recuperaciones obtenidas en el estudio, los analitos más polares (quinolinas, quinoxalinas y δ -carbolicinas) no muestran un comportamiento muy claro, aunque podría apuntarse un cierto aumento de la recuperación al aumentar la proporción de metanol en la disolución de lavado. En el caso de los analitos menos polares (PhIP, α -, β - y γ -carbolicinas), los porcentajes recuperados disminuyen al aumentar el contenido orgánico de la disolución, sobretodo en el caso de harman, Trp-P-1 y Trp-P-2. Sin embargo, es aconsejable evitar el uso de la mezcla con menor proporción de metanol debido a la elevada variabilidad observada y a su menor capacidad de limpieza de muestra.

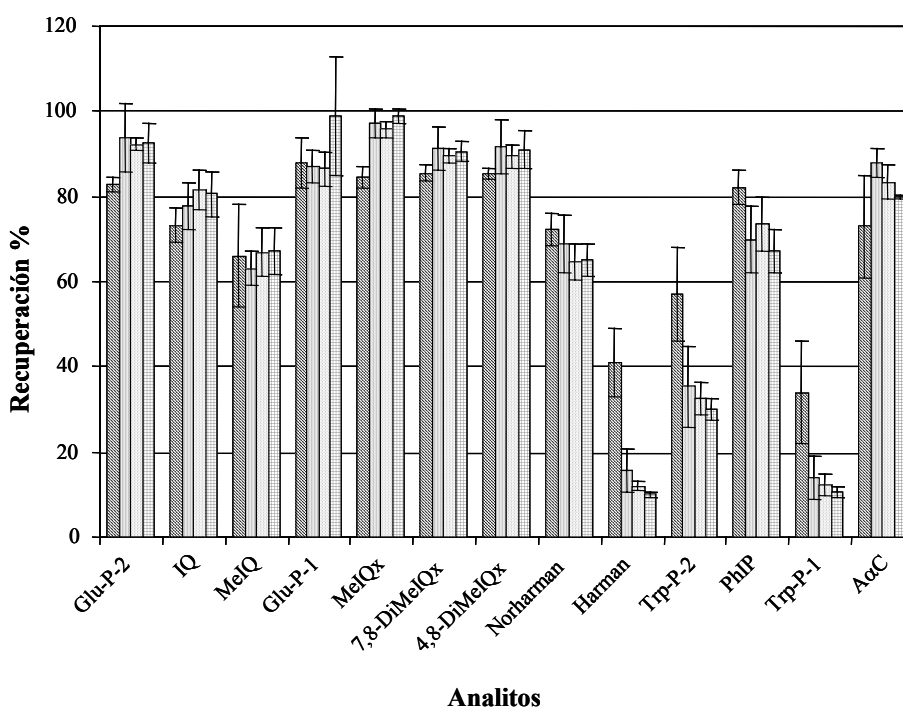


Figura 2.3.- Recuperaciones obtenidas con patrones al sustituir las mezclas ácidas de la etapa de lavado del cartucho PRS por mezclas hidroalcohólicas de diferente composición. Proporción MeOH/H₂O: ■ 2:8; □ 4:6; □ 5:5; □ 6:4.

Se utilizó a continuación este procedimiento para realizar el análisis de un extracto de carne liofilizado, utilizando como disolución de lavado del cartucho PRS 15 mL de MeOH/H₂O (4:6). Debido a la coelución de la TriMeIQx con interferencias, se utilizó la 7,8-DiMeIQx como patrón interno. En la Tabla 2.4 se dan los valores de recuperación obtenidos para los diferentes analitos así como los correspondientes resultados de la cuantificación. En la citada tabla, puede observarse que la recuperación de los analitos polares que se han podido analizar es de 60-96 %, lo que a grandes rasgos coincide con los resultados obtenidos en el análisis de disoluciones metanólicas. En cambio, la recuperación de los analitos menos polares ha sido algo mayor en el análisis de la muestra, sobretodo en el caso de la harman y la norharman. Este hecho podría deberse a la activación del proceso de intercambio iónico por parte de algunos componentes extraídos de la matriz.

Tabla 2.4.- Porcentajes de recuperación y cantidad encontrada de los analitos y sus respectivos intervalos de confianza ($\alpha=0,05$, $n=8$) tras aplicar el método de lavados MeOH/H₂O al análisis de un extracto de carne.

Compuesto	Rec. %	C.I.	Conc. (ng g ⁻¹)	C.I.
Glu-P-2	83,2	± 6,2	6	± 12
IQ	-		-	
MeIQ ^{*1}	85,1	± 8,4	23	± 12
Glu-P-1 ^{*1}	58,8	± 5,9	19,9	± 9,9
MeIQx	60,5	± 8,2	37	± 16
4,8-DiMeIQx	89,4	± 5,8	6,4	± 8,9
Norharman ^{*2}	75	± 14	118	± 11
Harman ^{*2}	70	± 13	260	± 35
Trp-P-2	46,4	± 4,2	7,1	± 8,6
PhIP	69,7	± 5,2	21,9	± 9,4
Trp-P-1	60,4	± 2,7	8,6	± 4,5
A α C	70,2	± 5,0	12	± 15

*1: identidad del pico no confirmada.

*2: cuantificación realizada a $\lambda=250$ nm (correspondiente al máximo de absorbancia del analito).

La baja recuperación observada para algunos de los analitos indica una débil adsorción en el propilsulfonato sódico, por lo que para aumentar la retención de estos compuestos en el cartucho PRS es conveniente la activación del intercambio iónico. Con el fin de evitar las pérdidas provocadas por los lavados ácidos, nos propusimos realizar previamente al paso de los analitos al acondicionamiento del cartucho de PRS con ácido

clorhídrico. De esta manera, el adsorbente se transforma en ácido propilsulfónico, capaz de ceder el protón a las HAs durante el paso de la muestra.

La aplicación de este método modificado, conjuntamente con los tres seleccionados de la bibliografía, se incluye en la comunicación científica del siguiente apartado (Artículo II). A continuación, en el Apartado 2.2.2.4 (Artículo III) se utiliza el mismo método modificado para estudiar el comportamiento de diversos cartuchos de extracción en fase sólida de diferentes características y marcas comerciales.

2.2.2.2. **Artículo II**

Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract

F. Toribio, L. Puignou y M.T. Galceran.

Journal of Chromatography A, 836 (1999) 223-233.

2.2.2.3. **Artículo III**

Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract

F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.

Journal of Chromatography A, 880 (2000) 101-112.

2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Un método de extracción ideal debería ser rápido, sencillo, eficiente y de bajo coste. Además, el medio de extracción debería ser inerte, tanto por lo que respecta al analito como al medio ambiente. Por último, el extracto originado debería tener el grado de limpieza y concentración tales que posibilitaran el análisis directo.

Muy frecuentemente, los métodos que utilizan disolventes líquidos incumplen estos objetivos. En algunos casos, como el de la extracción Soxhlet, el proceso dura varias horas, y origina un extracto considerablemente diluido. Asimismo, las medidas legislativas que restringen el uso de algunos disolventes orgánicos han conllevado la necesidad de desarrollar métodos alternativos, como la extracción con fluidos supercríticos (SFE) (Camel *et al.*, 1992; Chaudot *et al.*, 1997). En el campo del análisis de alimentos, la SFE ha sido ampliamente aplicada para extraer macrocomponentes como la grasa (Berg *et al.*, 2002), y también se ha utilizado a escala analítica para determinar el contenido de diferentes sustancias, como por ejemplo pesticidas (Lehotay, 1997).

2.3.1. Introducción y objetivos

Un fluido supercrítico se define como una sustancia que está por encima de sus valores críticos de temperatura y presión. En estas condiciones, las propiedades del fluido son intermedias entre las de un líquido y un gas, ya que combina un elevado poder de solvatación con una elevada difusividad (Hedrick *et al.*, 1992a). Desde un punto de vista cinético, la viscosidad de los fluidos supercríticos es entre 5 y 30 veces inferior a la de los líquidos, lo que implica que en el estado supercrítico los analitos ven facilitada su difusión con respecto al medio líquido. Además, como los fluidos supercríticos poseen una tensión superficial prácticamente nula, su penetrabilidad en los materiales porosos es mejor. La consecuencia más importante derivada de estas propiedades es que los fluidos supercríticos permiten realizar extracciones mucho más rápidamente que los disolventes convencionales.

Desde un punto de vista termodinámico, la densidad de un fluido supercrítico es similar a la de los líquidos, lo que confiere a estos fluidos un gran poder de solvatación. Por otro lado, es posible variar la densidad del fluido y por tanto la selectividad de la extracción simplemente con modificar la presión o la temperatura a la que se lleva a cabo. Dado que la mayoría de fluidos supercríticos son gases a condiciones ambientales, su

eliminación tras la extracción se realiza simplemente enfriando y despresurizando el sistema. De esta manera no se produce dilución de los analitos y se evita la contaminación originada por el uso de disolventes orgánicos.

El dióxido de carbono es el fluido supercrítico más utilizado debido principalmente a su baja temperatura crítica (31,1°C), que permite la extracción de compuestos termolábiles. Su presión crítica también es baja (72,8 bar), y además no es tóxico ni inflamable, y es miscible con la mayoría de disolventes excepto el agua y el ácido fórmico. Ahora bien, la baja polaridad del CO₂ supercrítico puro lo hace adecuado únicamente para la extracción de compuestos apolares o moderadamente polares. En el caso de extraer compuestos de mayor polaridad, se debe adicionar una pequeña cantidad de un disolvente polar, como se comentará más adelante.

En cuanto a los modos de extracción en SFE, el proceso se puede realizar en modo estático o dinámico. En el primer modo, se introduce una cantidad de fluido en la celda y se deja equilibrar el sistema. De esta manera, se asegura un buen contacto entre la muestra y el extractante. Sin embargo, este modo de extracción tiene el inconveniente de no ser exhaustivo, ya que el fluido supercrítico puede saturarse de analito u otros componentes de la matriz. En el modo dinámico, fluido supercrítico nuevo percola continuamente a través de la muestra. Generalmente este modo, además de extraer más rápidamente, permite obtener mayores recuperaciones. Lo más conveniente es llevar a cabo en primer lugar una etapa de pocos minutos en modo estático seguido de una etapa en modo dinámico de tal duración que permita recuperar la máxima cantidad posible de analito.

Previamente a la optimización de las condiciones de extracción, es importante tener en cuenta algunas consideraciones sobre la muestra que se pretende analizar. Por ejemplo, si la muestra es sólida es conveniente aumentar al máximo su superficie de contacto, teniendo en cuenta que si las partículas son de diámetro demasiado pequeño podrán compactarse impidiendo el paso del fluido. En cuanto al contenido en agua de la muestra, podría ser favorable para la extracción de compuestos polares. Sin embargo, la presencia de este disolvente conlleva el riesgo de formación de cristales de hielo que obturan el conducto de salida del sistema. Por este motivo, la muestra frecuentemente se mezcla con un agente desecante, como por ejemplo sulfato de sodio anhidro, sílice o tierra de diatomeas, entre otros (Burford *et al.*, 1993).

Entre los parámetros a optimizar hay que citar la presión de trabajo, ya que de su valor depende en gran medida la solubilidad en el fluido supercrítico del compuesto a

extraer. Otro de los factores importantes a optimizar es la temperatura a la cual se realiza la extracción. A una presión dada, un aumento de temperatura supone una disminución de la densidad del fluido. Por lo tanto, para los compuestos poco volátiles se observará un descenso de la solubilidad, mientras que para los compuestos volátiles el resultado global será un compromiso entre el descenso de solubilidad y el aumento de volatilidad.

A la hora de optimizar una extracción con fluidos supercríticos es necesario plantearse además la necesidad de adicionar al sistema un modificador (Levy *et al.*, 1992). El papel de este disolvente es el de asegurar la solubilidad de los compuestos a extraer en el fluido supercrítico, generalmente incrementando la polaridad del mismo. En otros casos, el modificador contribuye además a romper las interacciones entre la matriz y el analito, facilitando así la extracción. Incluso, algunos autores han propuesto la adición de agentes derivatizantes a la celda de extracción, de manera que los productos obtenidos sean más compatibles con el fluido supercrítico (Hawthorne *et al.*, 1992). Aunque han sido muchos los disolventes utilizados en la bibliografía como modificadores (metanol, acetonitrilo, agua, benceno, ácido fórmico, trietilamina, etcétera), no hay ninguna norma para la elección del más conveniente en cada caso. Algunos autores sostienen que el modificador actúa compitiendo con el analito por sitios activos de la matriz (Langenfeld *et al.*, 1994), por lo que conviene que ambos tengan una naturaleza similar. En el caso de utilizar un modificador, hay que tener en cuenta que los valores tanto de presión como de temperatura críticos varían en función de la cantidad de disolvente añadida. Por ejemplo, la adición de MeOH a CO₂ supercrítico en un 10% incrementa la presión crítica hasta 84 bares, mientras que la temperatura crítica aumenta hasta 51°C.

En principio, el flujo del fluido supercrítico debería también afectar la eficiencia de la extracción, ya que a mayor caudal la cantidad de fluido que interacciona con la muestra en un intervalo de tiempo dado es también mayor. Esta suposición es cierta si el proceso limitante de la extracción es la solubilidad del analito en el fluido supercrítico. Sin embargo, si el proceso está limitado por la interacción entre el analito y la matriz, el flujo apenas afecta el porcentaje de analito recuperado (Hawthorne *et al.*, 1995).

Para recuperar los analitos del fluido supercrítico se utilizan diversos procedimientos como por ejemplo el burbujeo a través de un líquido (trampa líquida) (Langenfeld *et al.*, 1992), el uso de una trampa criogénica (Ashraf-Khorassani *et al.*, 1992) o la adsorción sobre un sólido (trampa sólida) (Mulcahey *et al.*, 1991), siendo importantes la identidad del líquido en el primer caso y los adsorbentes utilizados en el tercero.

La SFE en el análisis de HAS

Entre las aplicaciones de la SFE a escala analítica descritas en la bibliografía, un 38% son de alimentos o productos naturales. De estos trabajos, la mayoría determinan compuestos volátiles y grasas, aunque también se ha descrito el análisis de pesticidas, residuos de fármacos o toxinas en diferentes alimentos.

Sin embargo, aunque la SFE constituye una atractiva alternativa a la SPE, en la bibliografía sólo se ha encontrado una publicación que aplique esta técnica de extracción al análisis de las HAS (Thiebaud *et al.*, 1994). En este trabajo, los humos desprendidos al freír carne se hicieron pasar a través de filtros de espuma de poliuretano y de resinas XAD-4. Tras triturar los filtros, éstos se colocaron en una celda y se extrajeron con CO₂ modificado con MeOH, tal y como se muestra en la Tabla 2.5.

Dada la escasa información disponible acerca del análisis de HAS en alimentos, se decidió estudiar las condiciones experimentales utilizadas en la extracción de compuestos de estructura química similar a las HAS en muestras alimentarias o en otras matrices. Así, la Tabla 2.5 incluye también las condiciones de trabajo para extraer N-nitrosaminas, triazinas o nicotina, entre otros. En todos los casos, se ha utilizado dióxido de carbono como fluido supercrítico.

Como se puede observar en la Tabla 2.5, las condiciones de extracción de las diferentes aminos son muy diversas. Así, los valores de presión oscilan entre 200 y 550 bar y los de temperatura entre 40 y 80°C. Casi todos los métodos combinan una etapa estática y una dinámica para realizar la extracción. En cuanto a modificadores, la mayoría de trabajos utilizan MeOH como modificador, aunque también se describe el empleo de modificadores básicos como NaOH o 1,6-hexanodiamina. Las condiciones de atrapado de los analitos también son muy variadas, ya que se utilizan tanto trampas líquidas (MeOH, hexano o DCM entre otros) como sólidas (octadecilsilice, gel de sílice, etcétera).

Dada la escasa información disponible en la bibliografía, el objetivo de esta parte del trabajo ha sido la de desarrollar metodología analítica basada en la extracción con fluidos supercríticos para la determinación de HAS en alimentos. Con este fin, se han optimizado los diferentes parámetros que influyen en la extracción y la colección de los analitos, utilizando para ello HAS adicionadas sobre un sólido inerte. Así, se ha estudiado el efecto derivado de variar la temperatura y la presión, y se ha investigado también la adición al sistema de diferentes modificadores, como metanol, amoníaco o trietilamina entre otros.

Además, se ha estudiado el uso de una trampa sólida conteniendo octadecilsilíce o propilsulfonato sódico, y se ha optimizado el volumen necesario para eluir los analitos del adsorbente. Finalmente, se han aplicado las condiciones establecidas al análisis de un extracto de carne liofilizado.

Tabla 2.5.- Métodos de SFE para las HAS y otros analitos similares.

Muestra	P (bar)	T (°C)	t (min)*	Modificador	Trampa	Ref.
Extracción con fluidos supercríticos de las HAS						
Humo de cocinado	410	55	10e+120d	10% MeOH	0,5 mL MeOH	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1994)
Extracción con fluidos supercríticos de N-nitrosaminas						
Tabaco	440	60	30e+45d	250 µL MeOH	Tenax-GR	(Prokopczyk <i>et al.</i> , 1992)
Salchichas de frankfurt, jamón y bacon	680	40	2e+15d	Ninguno	Gel de sílice	(Maxwell <i>et al.</i> , 1993; Pensabene <i>et al.</i> , 1995; Fiddler <i>et al.</i> , 1996)
Tabaco	355	60	15e+30d	10% MeOH	2 mL hexano	(Prokopczyk <i>et al.</i> , 1995)
Tabaco	355	60	5e+15d	10% MeOH	Tenax-GR	(Song <i>et al.</i> , 1999)
Extracción con fluidos supercríticos de triazinas						
Suelos, sedimentos y plantas	300	65	45d	10% MeOH:H ₂ O (98:2)		(Papilloud <i>et al.</i> , 1995)
Suelos	245	50	15e+30d	10% MeOH	Octadecilsilíce	(Dean <i>et al.</i> , 1996)
Suelos	300	80	15d	10% MeOH	5 mL EtOH	(Yarita <i>et al.</i> , 1996)
Extracción con fluidos supercríticos de otras aminas heterocíclicas						
Arena fortificada	355	50	10e+10d	500 µL 1,6-hexanodiamina	1 mL DCM	(Oostdyk <i>et al.</i> , 1993b) (Oostdyk <i>et al.</i> , 1993a)
Arena y suelo húmico	200	50	30d	Ninguno	1 mL iPrOH	(Janda <i>et al.</i> , 1994)
Pinturas	550	50	15e+15d	80 µL MeOH	10 mL DCM	(Garrigós <i>et al.</i> , 1998)
Suelo de compostado	300	70	5e+90d	5% MeOH	4 mL ACN	(Martínez <i>et al.</i> , 1995)
Agua	250	50	15d	NaOH y NaCl	Octadecilsilíce	(Hedrick <i>et al.</i> , 1992b)
Tabaco	200	50	30d	8% MeOH	5 mL MeOH	(Fischer <i>et al.</i> , 1996)

* e: modo estático, d: modo dinámico.

2.3.2. Trabajo experimental

El trabajo experimental realizado en esta parte de la memoria se llevó a cabo con un extractor de fluidos supercríticos Varian Star SFE PrepMaster (Suprex, Pittsburg, PA, USA), el cual consta de un módulo de extracción y un módulo de colección de los analitos. El primero incluye entre otros una bomba de alta presión para incorporar el modificador al fluido y un horno para fijar la temperatura de trabajo, mientras que el segundo incluye un restrictor variable, una trampa sólida y una bomba de LC para llevar a cabo la elución de los analitos de la trampa sólida.

La mayoría de experimentos con disoluciones estándar se realizaron llenando la celda de extracción con sulfato de sodio anhidro. Se trabajó también con un extracto de carne liofilizado (Pais, 1996), en cuyo caso se mezcló la muestra con sulfato de sodio anhidro. Las recuperaciones se calcularon utilizando una recta de calibrado que se establecía diariamente y añadiendo al sulfato de sodio o al extracto de carne unos 100 μ L de una disolución de HAs, lo cual suponía alrededor de 300 ng de cada analito.

El fluido supercrítico utilizado en todos los experimentos fue CO₂ de elevada pureza (> 99,998 %, Praxair, Madrid). El intervalo de presiones estudiadas fue 300-400 atm, mientras que la temperatura varió entre 50 y 100°C. Se estudiaron diferentes modificadores (MeOH, MeOH/NH₃, MeOH/KOH entre otros), variando su contenido entre 0% y 10%.

Para minimizar la obturación del restrictor, su temperatura se mantuvo a 40°C. Tras la expansión del gas, los analitos fueron adsorbidos en la trampa sólida, cuya temperatura se fijó en 20°C para evitar la condensación del modificador. Tras la elución de los analitos y en su caso la realización de una etapa adicional de purificación mediante SPE, el extracto se evaporó a sequedad con una corriente de nitrógeno y se redisolvió con una disolución metanólica que contenía 7,8-DiMeIQx, que actuó como patrón interno. El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando las condiciones indicadas en el Apartado 2.2.2.1.

Optimización de la etapa de elución de la trampa sólida

En la primera parte de esta optimización, se introdujeron unos 0,6 g de relleno de C18 en la trampa sólida y se adicionó la disolución metanólica de HAs directamente al adsorbente. A continuación, se utilizó metanol para eluir fracciones de 1 mL. Se observó que el máximo de recuperación de los analitos se alcanzaba con el primer mililitro,

habiendo en la segunda fracción únicamente pequeñas cantidades y no detectándose nada en la tercera. Por lo tanto, se tomaron 2 mL como volumen de elución óptimo.

Sin embargo, la baja recuperación obtenida para algunas carbolinas hizo pensar en la necesidad de aumentar el pH de la disolución de elución con el fin de disminuir la interacción con los grupos silanol de la sílice. Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 2.6, donde la primera columna de datos corresponde a la elución con 2 mL de MeOH y la segunda a la elución con 2 mL de MeOH:NH₃ (9:1). Como puede apreciarse, la introducción de una base afecta sobretodo a tres carbolinas (Glu-P-1, Glu-P-2 y A α C) y a la IQ, provocando un aumento de sus recuperaciones. Para los demás compuestos únicamente se ha observado un ligero descenso en la recuperación de algunos aminoimidazozaarenos.

Tabla 2.6.- Recuperaciones % obtenidas en el estudio de la elución del la trampa sólida de C18.

Analitos	Elución con MeOH	Elución con MeOH/NH₃
Glu-P-2	50,6	68,2
IQ	75,8	101,5
MeIQ	84,8	81,5
Glu-P-1	52,1	72,2
MeIQx	89,2	86,4
4,8-DiMeIQx	91,2	88,0
NH	86,8	85,1
H	94,1	87,4
Trp-P-2	65,9	63,7
PhIP	75,9	72,1
Trp-P-1	88,3	86,2
A α C	50,9	69,8

Para comprobar si este mismo comportamiento se mantenía al realizar una extracción con CO₂, se adicionaron HAs al sulfato de sodio anhidro. Ya que en los intervalos estudiados no se observó dependencia de las recuperaciones con la presión y la temperatura, se fijaron una presión de 400 atm y una temperatura de 80 °C para realizar la extracción, ya que estas condiciones son las más generalmente utilizadas en la bibliografía para este tipo de análisis. Por otro lado, se utilizó un 10 % de MeOH como modificador y se fijaron unos tiempos de 5 minutos para realizar la extracción en modo estático y 30 minutos en dinámico. En la primera serie de experimentos se eluyó la trampa sólida con 2 mL de metanol, mientras que en la segunda se utilizaron 2 mL de MeOH/NH₃ (9:1). Los

resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 2.4), de forma separada para carbolinas y aminoimidazoazaareños. De esta figura se deduce que para la mayoría de carbolinas la recuperación aumenta apreciablemente al eluir con MeOH/NH₃, los AIAs no se ven apenas afectados. Así, en los experimentos realizados con posterioridad se han utilizado 2 mL de MeOH/NH₃ (9:1) para eluir los analitos de la trampa sólida.

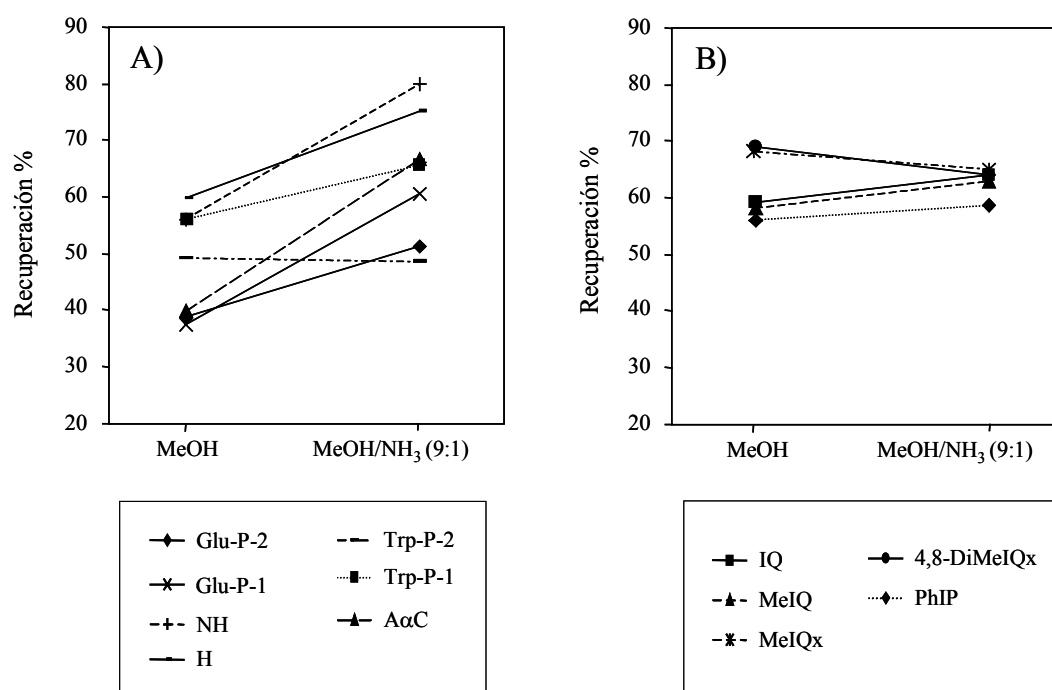


Figura 2.4.- Recuperaciones obtenidas con diferentes eluyentes de la trampa sólida para A) carbolinas y B) AIAs. Condiciones de la extracción: P= 400 atm, T= 80°C, fluido supercrítico: CO₂ con un 10 % en MeOH.

Efecto del modificador

En primer lugar, se estudió el efecto derivado de la adición a la celda de extracción de disoluciones metanólicas basificadas con amoníaco, trietilamina, hidróxido de potasio o hidróxido de tetrabutilamonio. Tras adicionar 100 μL de cada una de las mezclas y realizar las extracciones en las mismas condiciones anteriormente utilizadas (P=400 atm, T=80°C, 10% MeOH en CO₂), se observó que las recuperaciones más elevadas eran las obtenidas en presencia del hidróxido de tetrabutilamonio. Así, el siguiente paso fue la identificación de cuál era la proporción óptima entre el metanol y la base. Los resultados obtenidos se

muestran en la Figura 2.5, donde puede observarse que los mejores resultados correspondieron a la proporción MeOH/Bu₄NOH (9:1).

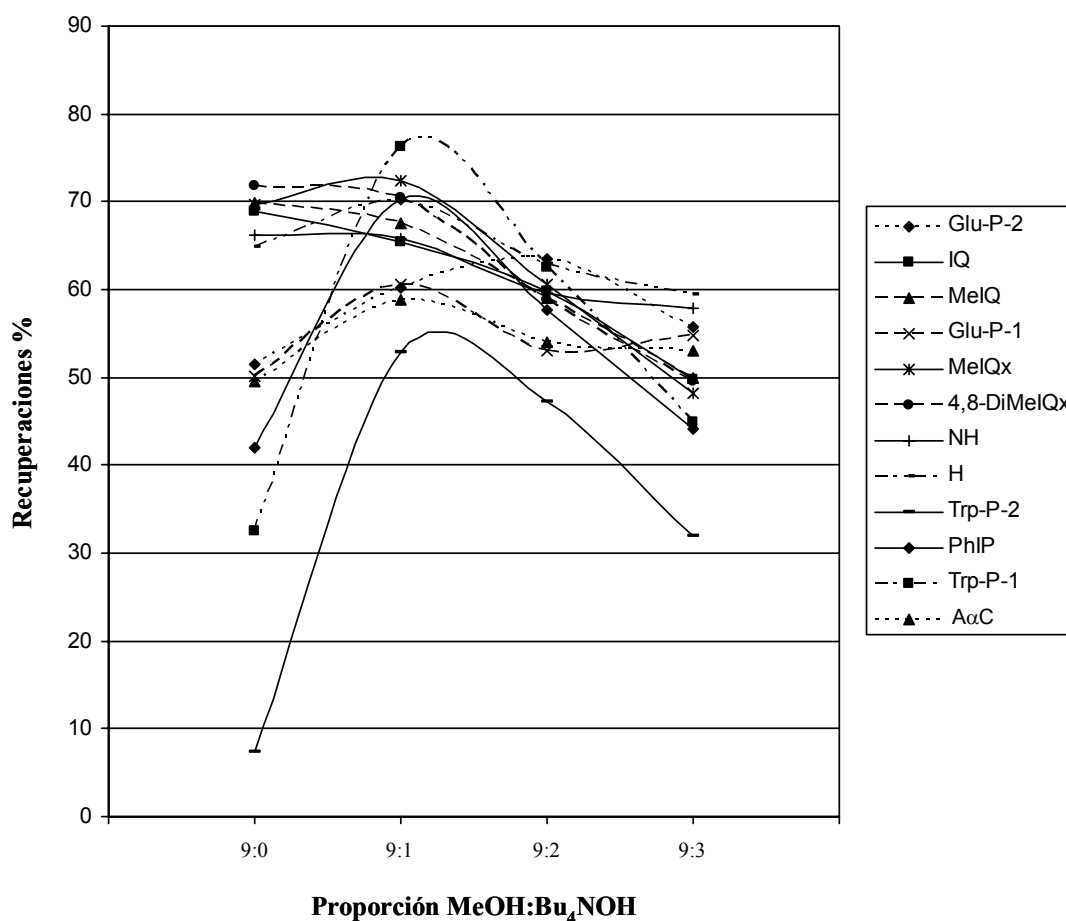


Figura 2.5.- Recuperación de los analitos adicionados a la celda con diferentes proporciones MeOH/Bu₄NOH. Condiciones de extracción: P= 400 atm, T= 80°C, fluido supercrítico: CO₂ con un 10 % en MeOH.

El marcado aumento en la recuperación de algunos analitos, sobretodo algunas carbolinas, al introducir la mezcla MeOH/Bu₄NOH (9:1) en el sistema hizo pensar en la necesidad de utilizar esta mezcla como modificador mezclado continuamente con el CO₂ supercrítico. En la siguiente figura (Figura 2.6) se muestra la variación de la recuperación de los analitos con el porcentaje de modificador en el fluido supercrítico. La máxima recuperación de los analitos, superior al 50% para todas las HAs, se obtiene al utilizar para la extracción CO₂ modificado en un 10% con MeOH/Bu₄NOH (9:1). Además, en la Figura 2.6 se pueden observar dos tipos de comportamiento diferente. Mientras que los aminoimidazoazaarenes aumentan su recuperación al incrementar la cantidad de

modificador, algunas carbolinas (Glu-P-1, Glu-P-2, H, NH, A α C) se extraen más eficazmente utilizando un 3 % de modificador que un 7 %. Esta diferente tendencia podría permitir llevar a cabo una extracción considerablemente selectiva de estas cinco carbolinas fijando el contenido de modificador en el fluido supercrítico en un 3 %. En cambio, si se pretenden analizar todos los analitos, sería necesario incrementar la cantidad de modificador hasta un 10 %.

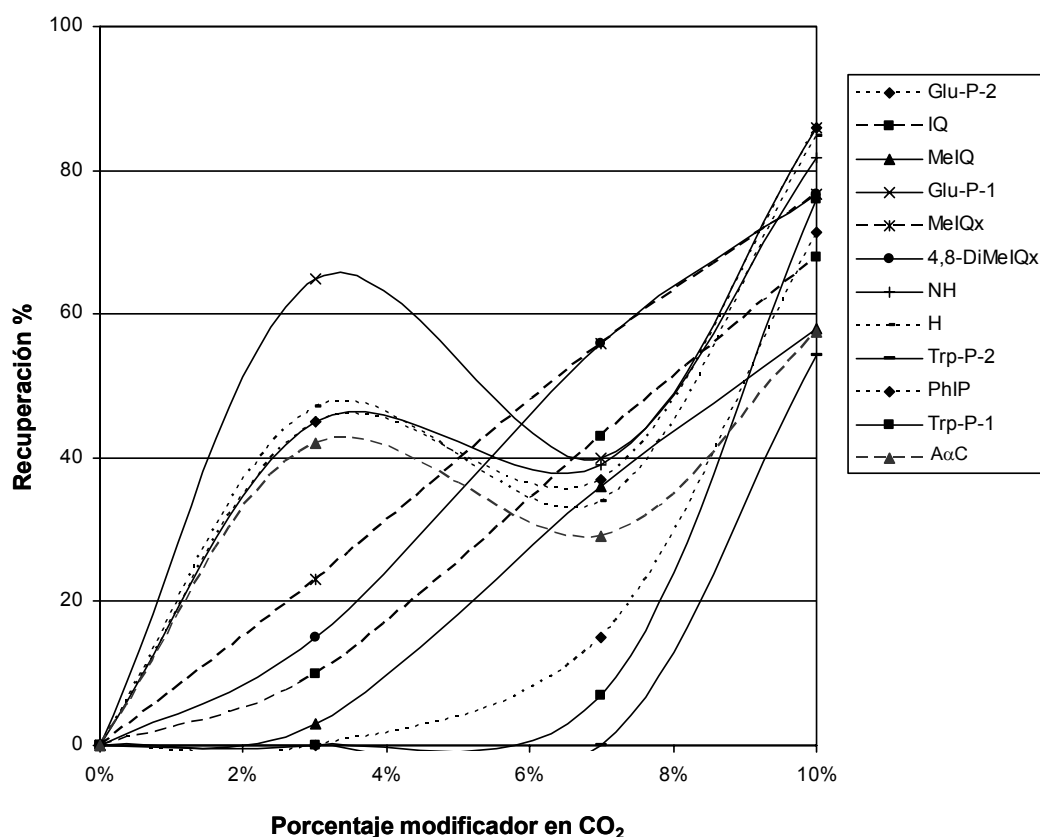


Figura 2.6.- Valores de recuperación de los analitos al extraerlos con CO₂ supercrítico modificado en diferentes porcentajes con una mezcla MeOH/Bu₄NOH (9:1).

Extracción de HAs en un extracto de carne liofilizado

Una vez optimizadas las condiciones de solubilidad máxima en el fluido supercrítico, nos propusimos comprobar la aplicabilidad del método establecido a la extracción de HAs en un extracto de carne liofilizado. La Figura 2.7 muestra el cromatograma obtenido tras inyectar el extracto obtenido en el sistema LC-UV(DAD).

Dada la extremada complejidad del cromatograma obtenido, sólo se pudieron identificar algunos analitos. Sus recuperaciones, determinadas cuando fue posible,

estuvieron comprendidas entre el 10 y el 40%. Ya que la cantidad de analito extraída era difícilmente mejorable, nos propusimos en primer lugar limpiar el extracto para lo que se realizó una preextracción con CO₂ puro. Sin embargo, el aspecto del cromatograma obtenido no difirió apenas del presentado en la Figura 2.7, lo que indica que las sustancias coextraídas no son de naturaleza apolar.

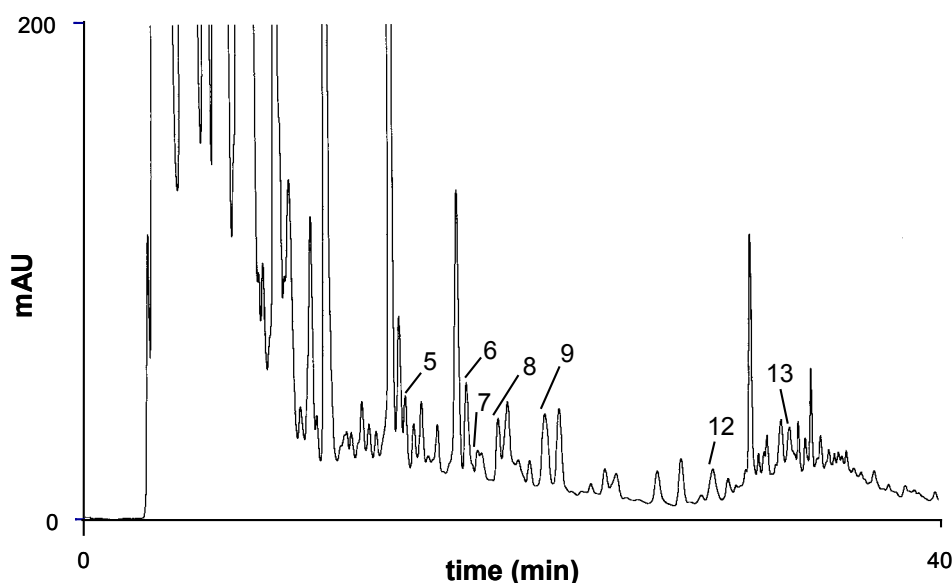


Figura 2.7.- Cromatograma correspondiente a la inyección en el sistema LC-UV(DAD) del extracto originado tras la extracción con CO₂ supercrítico de un extracto de carne liofilizado adicionado con 300 ng de HAs. Condiciones de la extracción: P= 400 atm, T= 80°C, modificador= 10 % MeOH/Bu₄NOH (9:1), adsorbente= C₁₈. Identificación de los picos: 5. MeIQx, 6. 7,8-DiMeIQx (P.I.), 7. 4,8-DiMeIQx, 8. Harman, 9. Norharman, 12. Trp-P-1, 13. AαC.

A continuación, se sustituyó el C₁₈ de la trampa sólida por ácido propilsulfónico, con la pretensión de mejorar la selectividad en la etapa de colección de los analitos. Al eluir los analitos directamente de este adsorbente mediante el paso de 2 mL de MeOH/NH₃ (9:1), las recuperaciones obtenidas fueron algo mayores a las correspondientes a la octadecilsilíce (5-60 %), pero la retención no fue tan selectiva como era de esperar. Por ello, se probó a lavar el adsorbente con 5 mL de una disolución hidroalcohólica (MeOH/H₂O, 4:6), y tal y como se muestra en la Figura 2.8 se consiguió una mejora de la limpieza del extracto en detrimento de la cantidad recuperada de analito (5-40%).

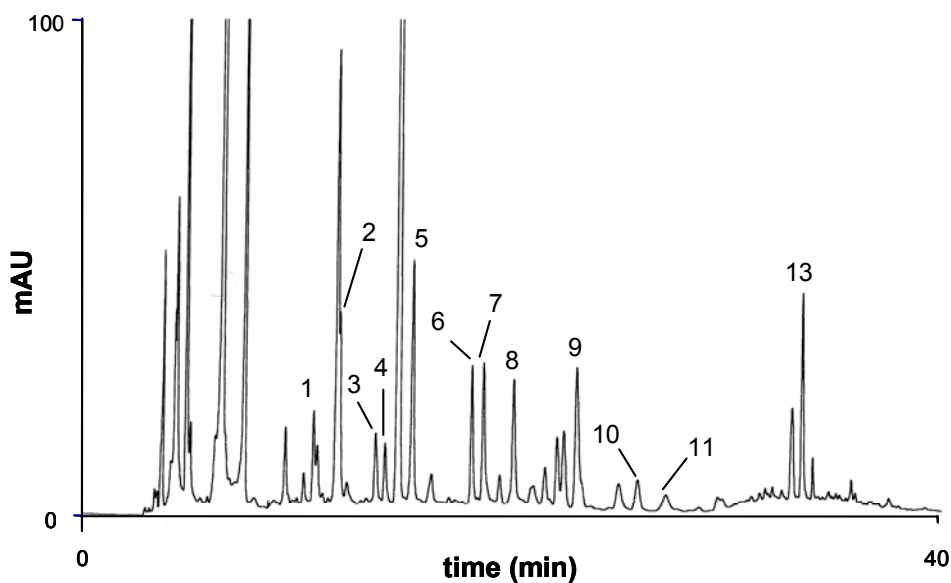


Figura 2.8.- Cromatograma correspondiente a la inyección en el sistema LC-UV(DAD) del extracto originado tras la extracción con CO₂ supercrítico de un extracto de carne liofilizado adicionado con 300 ng de HAs. Condiciones de la extracción: P= 400 atm, T= 80°C, modificador= 10 % MeOH/Bu₄NOH (9:1), adsorbente= PRS. Identificación de los picos: 1. Glu-P-2, 2. IQ, 3. MeIQ, 4. Glu-P-1, 5. MeIQx, 6. 7,8-DiMeIQx (P.I.), 7. 4,8-DiMeIQx, 8. Norharman, 9. Harman, 10. Trp-P-2, 11. PhIP, 13. A α C.

Los estudios realizados empleando la SFE han puesto de manifiesto la complejidad de esta técnica de extracción para el análisis de compuestos traza en matrices alimentarias. Dado que tan sólo se ha conseguido una matriz suficientemente limpia en unas condiciones en las que las recuperaciones de los analitos son bajas, se ha descartado el uso de la SFE en experimentos posteriores.

2.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se ha llevado a cabo una comparación de diferentes métodos de tratamiento de muestra basados en el acoplamiento de las columnas de tierra de diatomeas, PRS y C18. Entre los métodos comparados, mostrados en la Tabla 2.1, se encuentra en primer lugar el propuesto por G. Gross (Gross, 1990), el cual proporciona un único extracto (Método 1). También se ha incluido en el estudio el método propuesto por el mismo autor y modificado por nuestro grupo (Galceran *et al.*, 1996) (Método 2). Este método origina dos extractos que contienen respectivamente los analitos polares y los menos polares. Otro de los métodos comparados ha consistido en un método que incluye una etapa adicional de purificación (Perfetti, 1996) (Método 3). Se ha estudiado también un método similar al Método 1, pero sustituyendo el ácido de los lavados por agua (Método 4). Finalmente, se ha aplicado también un método equivalente al Método 4 pero que incluye un proceso de acondicionamiento del cartucho PRS con ácido (Método 5).

Los porcentajes de recuperación obtenidos al extraer y purificar las HAs de disoluciones metanólicas se muestran en la Figura 2.9, e indican en primer lugar que los métodos 1 y 3 únicamente permiten recuperar los analitos más polares. Además, mientras que con el Método 1 las recuperaciones de estos analitos es alta (65-100 %), al utilizar el Método 3 los porcentajes de recuperación han sido bajos (30-55 para quinolinas y quinoxalinas y <3,5% para δ -carbolinas) y se ha observado una mayor dispersión en los resultados.

El hecho de que con el método de dos extractos (Método 2) la cantidad de HAs apolares recuperadas al recoger los lavados ácidos del cartucho PRS sea del 60-80 % (Figura 2.9) indica que la pérdida de estos compuestos se produce durante la etapa de limpieza del intercambiador catiónico. Dado que con el Método 2 la recuperación de todos los analitos es elevada y los intervalos de confianza son aceptables, este método es recomendable para el análisis de HAs. Sin embargo, hay que señalar que este método implica un cierto trabajo adicional y un mayor tiempo de análisis, ya que se generan dos extractos que requieren tratamientos y análisis independientes.

Por otro lado, mediante la sustitución de los lavados ácidos del intercambiador catiónico por mezclas hidroalcohólicas (Métodos 4 y 5), se ha conseguido preconcentrar todos los analitos en un único extracto. En el caso de las HAs polares, ambos métodos han proporcionado recuperaciones elevadas (60-100%), valores que son similares e incluso

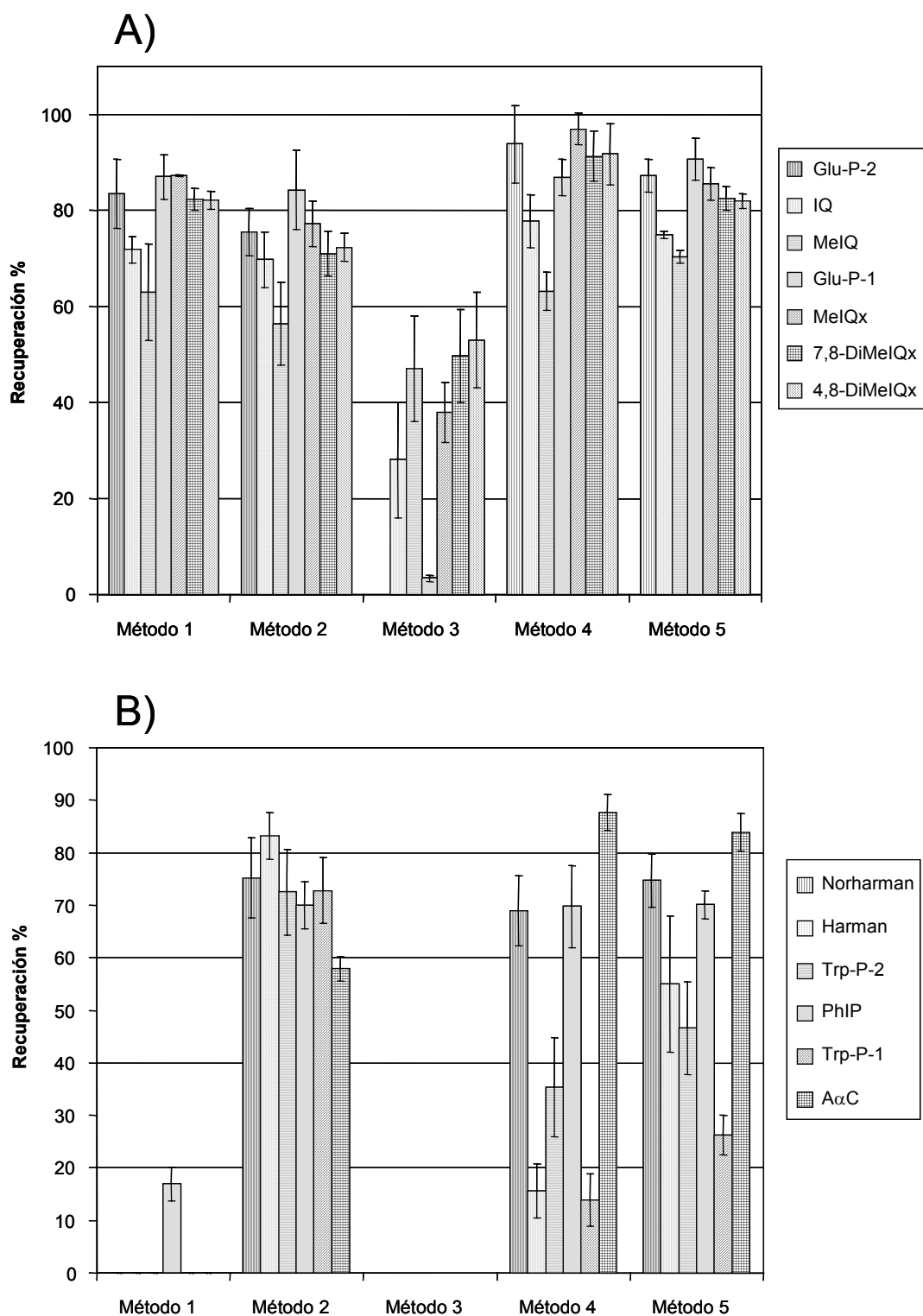


Figura 2.9.- Recuperación de los A) analitos polares y B) analitos apolares y sus respectivos intervalos de confianza obtenidos al tratar disoluciones metanólicas de HAs con los diferentes métodos comparados.

superiores a los obtenidos al utilizar el método de dos extractos. Con el Método 4, en el cual se elimina la activación del proceso de intercambio iónico, la recuperación de las HAs menos polares ha sido considerablemente alta (70-90 %) para la norharman, la PhIP y la A α C. En cambio, para el resto de compuestos ha sido considerablemente menor, ya que la harman y la γ -carbolinas únicamente se han recuperado en un 15-35 %. Al realizar el preacondicionamiento ácido (Método 5) la recuperación de estos tres últimos compuestos se incrementa hasta un 25-55 %, lo que pone de relieve la importancia de la activación del intercambiador iónico para algunas HAs. Así, parece ser que este método se puede proponer como una buena alternativa al método de dos extractos, ya que no solamente se recuperan todos los analitos con una eficacia y unos intervalos de confianza aceptables, sino que además se obtiene un único extracto a analizar.

Con el fin de evaluar el comportamiento de todos los métodos estudiados, se ha realizado el análisis de un extracto de carne liofilizado (Pais, 1996). Los valores de recuperación para los analitos polares y apolares con los diferentes métodos se muestran en la Figura 2.10. Como puede observarse, el comportamiento concuerda con el obtenido con las disoluciones metanólicas. Así, mientras que con el Método 3 sólo se han recuperado quinolinas y quinoxalinas (recuperaciones 40-70 %), con los demás métodos estudiados todas las HAs polares han sido eficientemente recuperadas (60-90 %). Sin embargo, hay que señalar que con los Métodos 4 y 5 ha sido imposible el análisis de la IQ debido a la coelución con una sustancia que interfería en la detección por UV. En el caso de las HAs menos polares, su recuperación ha sido aceptable (45-80 %) con los Métodos 2, 4 y 5. Sin embargo, la menor limpieza del extracto apolar originado por el Método 2 ha impedido la determinación de la A α C, ya que este analito coeluye con una interferencia. Por otro lado, las desviaciones estándar obtenidas con el Método 4 han sido mayores que las del Método 5, por lo que este último método parece ser el más adecuado para analizar las HAs en alimentos.

Una vez demostrada la utilidad del procedimiento desarrollado en esta memoria que preconcentra todas las HAs en un único extracto, se evaluó el uso de diferentes adsorbentes en las dos etapas del método. En primer lugar, nos propusimos estudiar cartuchos PRS que originalmente ya se encontrasen en forma ácida, de manera que se pudiera simplificar la etapa de acondicionamiento. También nos pareció conveniente evaluar la utilización de varios rellenos C18, ya que las diferencias en la estructura del material podían derivar

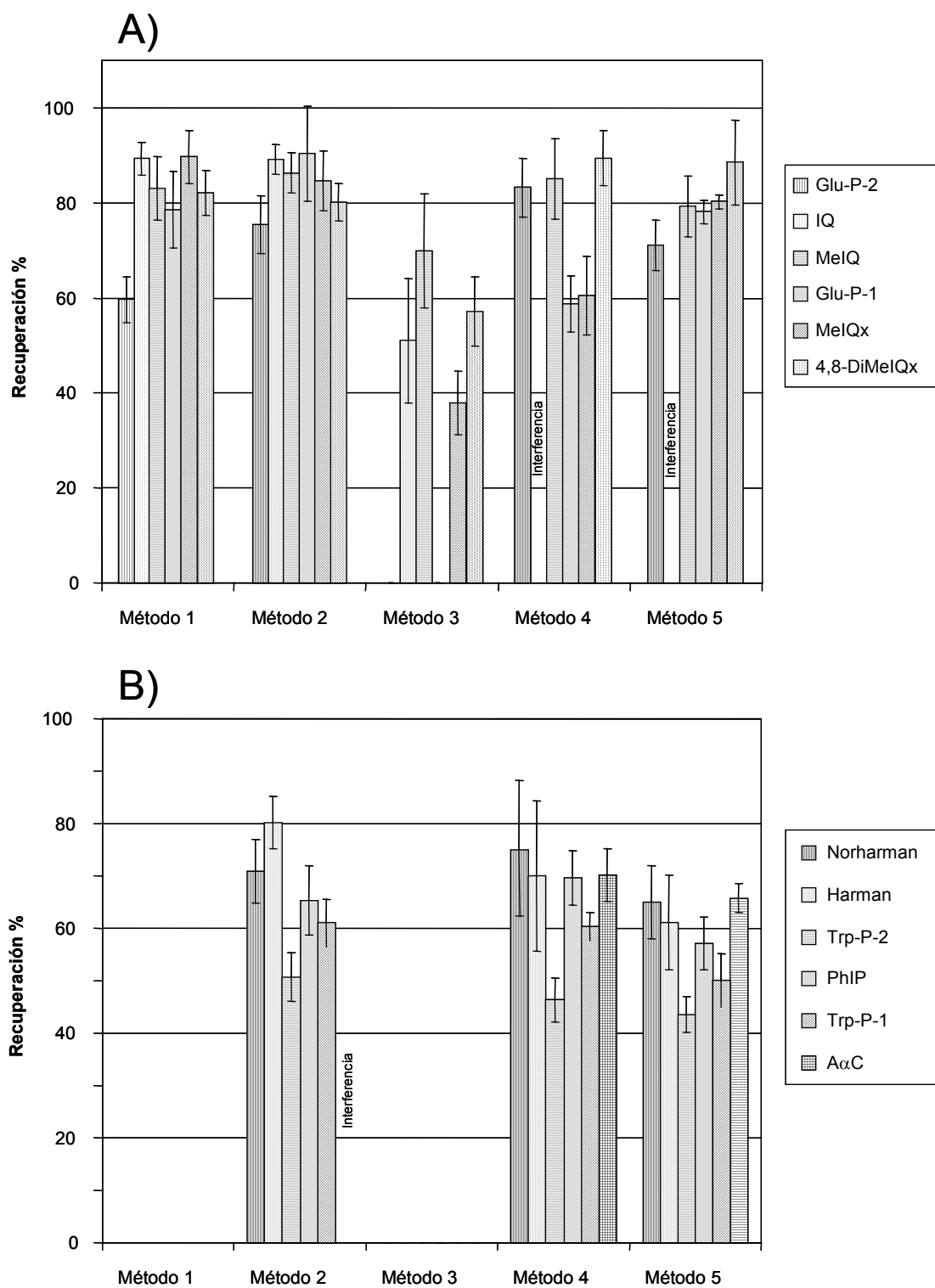


Figura 2.10.- Recuperación de los A) analitos polares y B) analitos apolares y sus respectivos intervalos de confianza obtenidos al tratar un extracto de carne liofilizado con los diferentes métodos comparados.

en modificaciones en la selectividad del proceso de tratamiento de muestra así como en cambios en la eficiencia de la extracción y purificación de los analitos. Los cartuchos empleados en el estudio se resumen en la Tabla 2.7. Así, las combinaciones de cartuchos designadas como métodos 1-4 permiten comparar distintos cartuchos de intercambio catiónico, mientras que el comportamiento de varios cartuchos de C18 se ha estudiado en los métodos 1,5-7.

Tabla 2.7.- Características principales de los diferentes adsorbentes estudiados para extraer las HAS de la muestra.

	Características principales	Observaciones	Utilizado en métodos*
Cartucho PRS	Bond Elut PRS, 500 mg, forma sódica	Preac. con ácido	1, 5, 6, 7
	Isolute PRS, 200 mg, forma ácida	-	2
	Isolute PRS, 500 mg, forma ácida	-	3
	Isolute PRS, 500 mg, forma ácida	Preac. con ácido	4
Cartucho C18	Bond Elut C18, 100 mg, trifuncional, <i>endcapped</i>	-	1, 2, 3, 4
	Isolute C18, 100 mg, monofuncional, <i>non-endcapped</i>	-	5
	Isolute C18, 100 mg, trifuncional, <i>non-endcapped</i>	-	6
	Isolute C18, 100 mg, trifuncional, <i>endcapped</i>	-	7

* Los métodos siguen la nomenclatura del artículo III (Apartado 2.2.2.4).

La cuantificación de las HAS se ha realizado mediante el método LC-MS descrito en el Capítulo 3 de la memoria (Apartado 3.2.2.2). Además, se ha utilizado un detector UV en línea para apreciar posibles cambios cualitativos que podrían pasar inadvertidos al utilizar un detector tan selectivo como el espectrómetro de masas. En la Figura 2.11 se muestran gráficamente los valores de recuperación obtenidos para cada analito con las diferentes combinaciones de cartuchos PRS-C18. Como puede observarse en esta figura, en la mayoría de los casos (quinoxalinas, PhIP, α - y δ -carbolinas, norharman) se han observado diferencias inferiores al 10 %. En el caso de las quinolinas (IQ y MeIQ) se han obtenido recuperaciones hasta un 20 % mayores al utilizar el cartucho Isolute PRS de 200 mg sin preacondicionar y el cartucho Isolute C18 monofuncional (métodos 3 y 5 respectivamente). Las variaciones más importantes en las recuperaciones se han producido para la harman y las γ -carbolinas, que pasan del 35-60 % al utilizar los métodos 1,2,5,6 y 7 a valores inferiores al 30 % cuando se utilizaron los cartuchos de SPE Isolute PRS de 500 mg, tanto preacondicionados como sin preacondicionar (Métodos 3 y 4). Esta baja recuperación

obtenida para las γ -carbolinas al utilizar los cartuchos de intercambio iónico de mayor tamaño puede ser debida a una gran retención en el adsorbente.

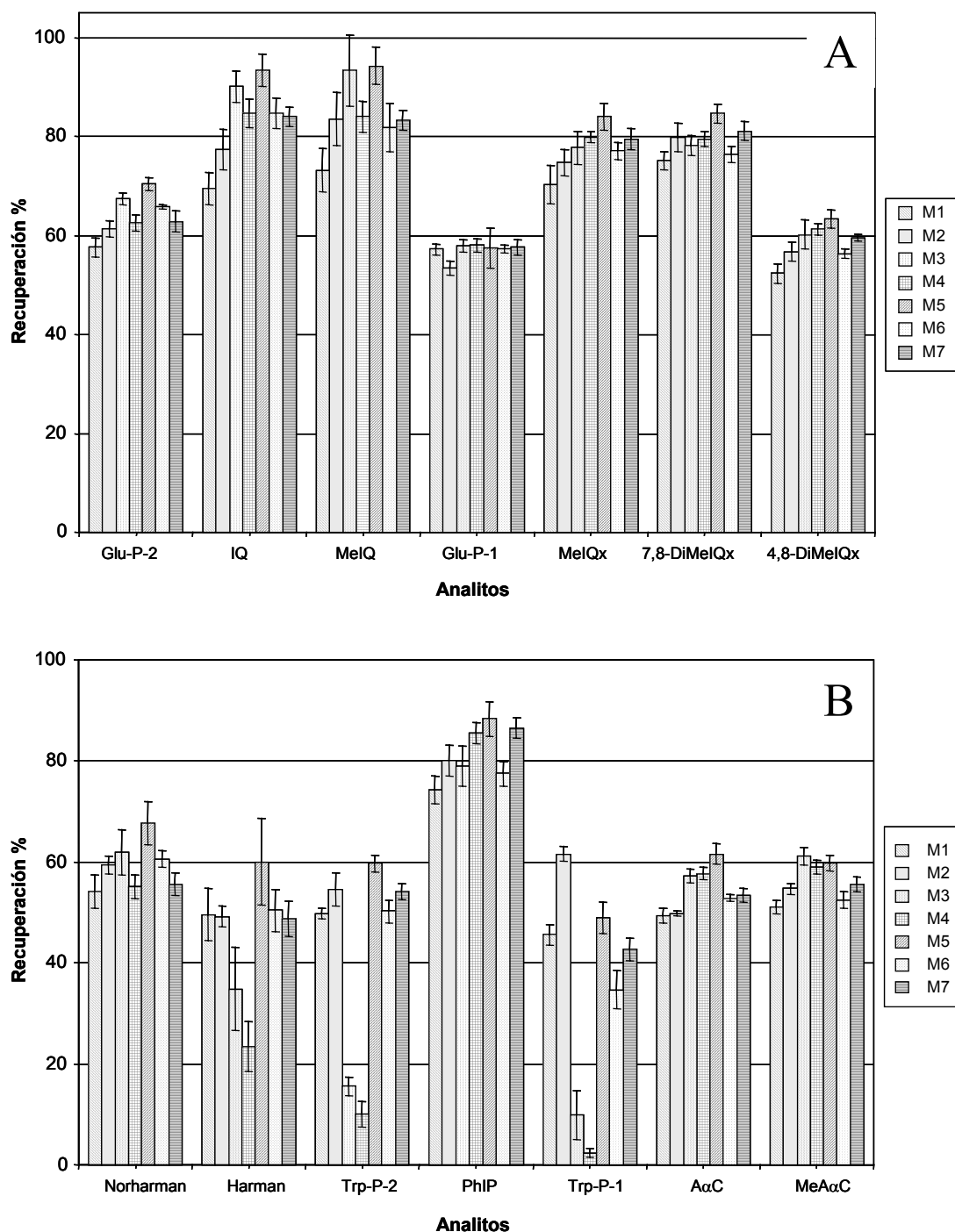


Figura 2.11.- Recuperación obtenida con las diferentes combinaciones de cartuchos estudiadas para las A) aminas polares y B) aminas apolares. Las horquillas corresponden a los valores de desviación estándar.

El estudio llevado a cabo con los diferentes adsorbentes ha puesto de manifiesto diferencias en las recuperaciones de los analitos y también ha revelado ciertas diferencias en la selectividad. Así, por ejemplo, el uso de un cartucho C18 *endcapped* (método 7) ha permitido reducir considerablemente la coextracción de una interferencia que eluia cerca del pico cromatográfico correspondiente a la MeIQx, tal y como se observa en la Figura 2.12.

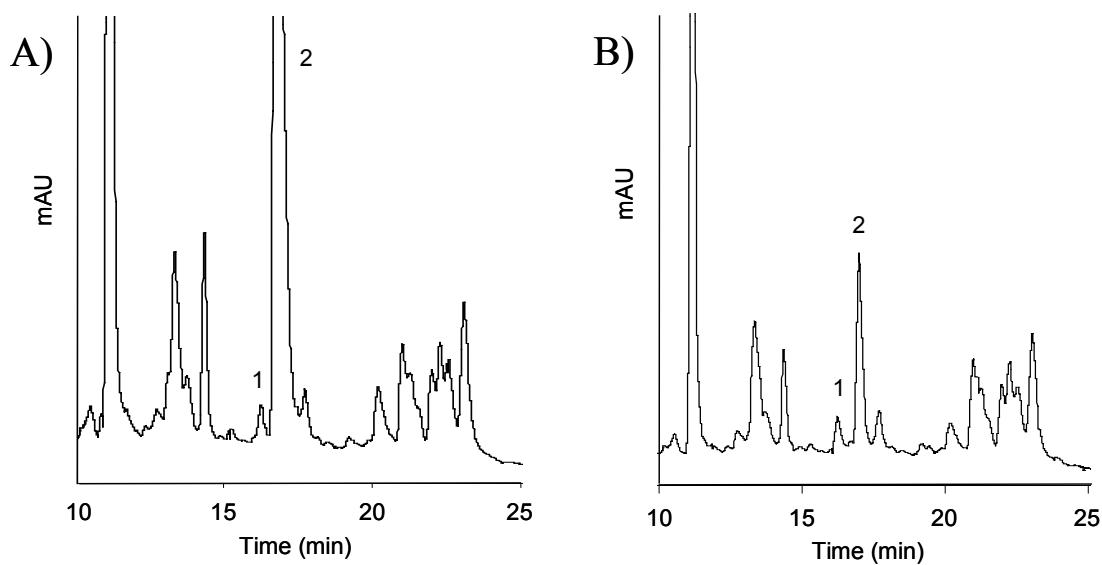


Figura 2.12.- Cromatogramas LC-UV obtenidos al utilizar A) un cartucho C18 *non-endcapped* (Metodo 6) y B) un cartucho C18 *endcapped* (Método 7). Identificación de picos: 1. MeIQx; 2. Sustancia coextraída.

Por otro lado, se ha realizado la cuantificación de las HAs presentes en un extracto de carne liofilizado y los resultados se indican en la Tabla 2.8. A pesar de las diferencias observadas en los valores de recuperación y en la selectividad de la SPE, los valores de la tabla ponen de manifiesto que, teniendo en cuenta los intervalos de confianza para $\alpha = 0,05$ y $n = 8$, las concentraciones calculadas para los diferentes métodos son equivalentes. En general, las RSD fueron inferiores al 15 %. En el caso de harman con los Métodos 3 y 4, el valor de RSD superó el 20 % debido a la baja recuperación del analito.

Además de haber demostrado que el método de tratamiento de muestra desarrollado por nuestro laboratorio proporciona resultados satisfactorios, este estudio ha puesto de manifiesto la variabilidad entre los adsorbentes existentes en el mercado. Por ejemplo, con el uso de un cartucho de ácido propilsulfónico de 200 mg se ha conseguido eliminar el proceso de activación con ácido necesario si se emplea propilsulfonato sódico como

adsorbente. En otros casos, se han observado variaciones en la selectividad del proceso de purificación, lo cual puede ser bastante crítico al utilizar un sistema de detección como el UV. Estas diferencias entre marcas comerciales y estructuras de los adsorbentes sugieren la necesidad de realizar estudios previos para seleccionar el cartucho más adecuado para cada tipo de muestra o cada sistema de determinación.

Tabla 2.8.- Concentración de los analitos encontrados en la muestra calculados con los diferentes métodos utilizados. Las desviaciones estándar se indica entre paréntesis.

Analitos	Métodos						
	1	2	3	4	5	6	7
	$ng\ g^{-1}$ (SD)	$ng\ g^{-1}$ (SD)	$ng\ g^{-1}$ (SD)	$ng\ g^{-1}$ (SD)	$ng\ g^{-1}$ (SD)	$ng\ g^{-1}$ (SD)	$ng\ g^{-1}$ (SD)
IQ	32,5 (7,3)	37,4 (2,7)	31,2 (4,2)	37,4 (7,5)	37,5 (3,2)	35,1 (2,8)	34,4 (4,9)
MeIQx	41,4 (2,6)	45,9 (3,9)	46,1 (2,1)	39,9 (1,3)	40,2 (1,4)	39,6 (2,7)	40,1 (1,5)
4,8-DiMeIQx	9,7 (1,7)	12,9 (1,6)	11,5 (0,9)	9,9 (1)	10,9 (0,4)	13,3 (1,1)	11,5 (2,9)
Norharman	145,5 (9,9)	147,5 (5,6)	137,2 (23,3)	118,7 (6,3)	127,9 (9)	135,1 (3,7)	158,6 (11,8)
Harman	264 (40,3)	360,3 (15,7)	303,3 (72,7)	327,3 (72,8)	303,9 (43,9)	287,5 (23,4)	302,2 (22,7)
PhIP	27,1 (1,0)	31,3 (2)	28,5 (1,6)	24,4 (1,3)	25,1 (1,2)	25,7 (0,8)	26,6 (1,1)

2.5. CONCLUSIONES

El trabajo experimental incluido en el Capítulo 2 de la memoria nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- La cromatografía de líquidos en fase invertida con detección UV con diodos en serie puede utilizarse para la determinación de aminas heterocíclicas en matrices sencillas, ya que en matrices más complejas la presencia de interferencias dificulta el análisis de algunos compuestos.
 - La separación de las HAs estudiadas ha sido posible empleando una columna C₁₈ desactivada para bases utilizando un gradiente binario basado en mezclas de fosfato de trietilamina a pH 3,3 y acetonitrilo.
 - El método de análisis establecido ha mostrado una buena linealidad en el intervalo de concentraciones de trabajo, siendo el coeficiente de regresión superior a 0,999 en todos los casos. La precisión del método ha sido satisfactoria, ya que tanto la repetitividad como la precisión a medio plazo de la relación de áreas ha oscilado entre el 1,1 y el 9,7 %.
 - Los elevados límites de la detección UV (0,2-1,5 ng inyectados para disoluciones patrón) y la baja selectividad proporcionada por esta técnica tan sólo permite usar esta metodología para la determinación de HAs a elevadas concentraciones y en muestras sencillas. En el caso de matrices complejas, es necesario el empleo de tratamientos de muestra laboriosos que permitan por un lado purificar la muestra y por otro recuperar la máxima cantidad posible de los analitos.
- Los métodos de *clean-up* basados en el acoplamiento en línea de la extracción líquido-líquido con la extracción en fase sólida han demostrado ser muy adecuados para la purificación y preconcentración de HAs, debido principalmente a las escasas etapas de transferencia existentes.
 - Aunque el método propuesto por Perfetti (Perfetti, 1996), que incluye una etapa adicional de purificación con un cartucho SCX, está limitado al análisis de quinolinas y quinoxalinas, la mayor limpieza conseguida lo hace aconsejable

para analizar muestras de un elevado grado de complejidad. Sin embargo, la etapa adicional de extracción conlleva un aumento notable de las desviaciones estándar y una disminución del porcentaje de recuperación de los analitos (< 50%).

- Otro de los métodos estudiados, el método de dos extractos, permite la determinación de todas las HAs mediante la recolección de los lavados provenientes del cartucho de intercambio iónico. La recuperación es elevada para todos los analitos (> 60%), pero tanto la complejidad del proceso como la cantidad de materiales requeridos es considerable. Además, la necesidad de inyectar dos extractos aumenta de manera importante el tiempo de análisis.
- La importancia de la activación del proceso de intercambio iónico en el cartucho PRS ha sido puesta de manifiesto, sobretodo para harman, Trp-P-1 y Trp-P-2. La activación previa al paso de los analitos ha permitido desarrollar un método en el que se obtiene un único extracto que contiene todos los analitos con recuperaciones aceptables (30-90%), lo que reduce significativamente el tiempo y el material necesarios en el proceso de tratamiento de muestra. Aunque proponemos este método para el análisis de HAs en alimentos, hay que tener en cuenta que el menor grado de limpieza alcanzado en la zona polar del cromatograma hace conveniente el uso de un sistema de detección más selectivo que el UV en el caso de analizar muestras complejas.
- El estudio del comportamiento de adsorbentes de diferente origen comercial o con diferencias estructurales ha puesto de manifiesto variaciones tanto en los valores de recuperación como en la selectividad del proceso de tratamiento de muestra.
 - Se han observado diferencias significativas en las recuperaciones de algunos analitos (harman, Trp-P-1 y Trp-P-2) al modificar el intercambiador catiónico utilizado. Se propone utilizar un cartucho de base sílice funcionalizado con ácido propilsulfónico, ya que no es necesaria la activación con ácido del proceso de intercambio iónico y se consiguen recuperaciones del 50-85 %.
 - Las diferencias en la estructura de los adsorbentes C18 utilizados ha derivado en variaciones en la recuperación de los analitos y en la cantidad coextraída de algunas interferencias. En nuestro caso, los mejores resultados se han obtenido utilizando un adsorbente *endcapped*, ya que se han obtenido buenas

recuperaciones y se ha minimizado la presencia de una interferencia de la MeIQx.

- Se ha evaluado el uso de la extracción con fluidos supercríticos para el análisis de HAs. Aunque se han conseguido buenos resultados con disoluciones patrón, la técnica ha proporcionado resultados menos satisfactorios que los métodos LLE-SPE en el tratamiento de muestras.
 - El estudio de disoluciones estándar mostró que la solubilidad máxima de los analitos se conseguía al utilizar como fluido supercrítico CO₂ modificado en un 10 % con Bu₄NOH/MeOH (1:9) y al fijar una presión de 400 atm y una temperatura de 80°C. Para la recolección se empleó una trampa sólida de octadecilsílice de la que se eluyeron los analitos con 2 mL de MeOH/NH₃ (9:1).
 - La aplicación de la extracción con fluidos supercríticos a un extracto de carne liofilizado mostró unas bajas eficiencias en la extracción (< 40 %). Además, se extrajeron una gran cantidad de compuestos interferentes. La limpieza del extracto final se incrementó sustituyendo el C18 de la trampa de colección por PRS e incluyendo una etapa de lavado del adsorbente con una mezcla MeOH/H₂O. Sin embargo, las recuperaciones fueron bajas, en algunos casos de tan sólo el 5%, por lo que este método no cumple los requerimientos mínimos para ser aplicado al análisis de HAs en alimentos.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 836 (1999) 223–233

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract

F. Toribio, L. Puignou*, M.T. Galceran

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

Received 10 August 1998; received in revised form 22 December 1998; accepted 23 December 1998

Abstract

Along with other mutagenic and carcinogenic contaminants in foods such as aflatoxins and polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic aromatic amines (HAAs) have received considerable attention in recent years. A major drawback in the analysis of HAAs in foods is their very low level of concentration ($0.1\text{--}50\text{ ng g}^{-1}$) as well as matrix interferences. Solid-phase extraction (SPE), forming an integral part of chromatographic analysis, is one of the procedures currently used for the extraction and purification of HAAs in food samples. In this paper a comparative study of several SPE procedures for HAAs determination was performed. Recoveries of the heterocyclic amines in the analysis of both a simple matrix such as a standard methanolic solution and a contaminated meat extract were established. HAAs were determined by HPLC analysis with photodiode-array detection (DAD) of the purified extracts, and the adequacy of different clean-up procedures for the analysis of a contaminated meat extract was discussed. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Clean-up methods; Solid-phase extraction; Meat; Amines, heterocyclic

1. Introduction

Heterocyclic aromatic amines (HAAs) comprise a variety of basic compounds belonging to two main chemical classes, aminocarboline and aminoimidazoazaarenes, to which humans are regularly exposed [1]. These chemicals constitute a major health risk due to their potent mutagenic activity [2,3]. Most HAAs are produced at trace quantities (ng g^{-1} level) from protein rich foods, such as meat and fish, when they are processed by thermal treatments, that is, typical cooking practices [4]. Previous studies have shown that meat extracts, some beef flavours and other kinds of matrices including wine, beer and environmental samples also contain potent

mutagenic HAAs [5–8]. To date, more than 20 HAAs have been isolated as mutagens, and the structures of 19 of them have been elucidated [9] and are shown in Fig. 1. All 10 HAAs so far examined have proved to be carcinogenic in experimental animals with target organs including the lung, liver, mammary gland, colon and skin [10,11]. In addition, several epidemiological studies have revealed a positive association between consumption of cooked meat and fish and development of tumours [12,13], thus, it has been demonstrated that people who eat heavily browned meat are at 2.0–6.0-fold higher risk of colorectal cancer development [14].

A major drawback in the analysis of HAAs from foods is their very low level of concentration ($0.1\text{--}50\text{ ng g}^{-1}$) and the high number of matrix interferences. For the analysis of these compounds, a variety

*Corresponding author.

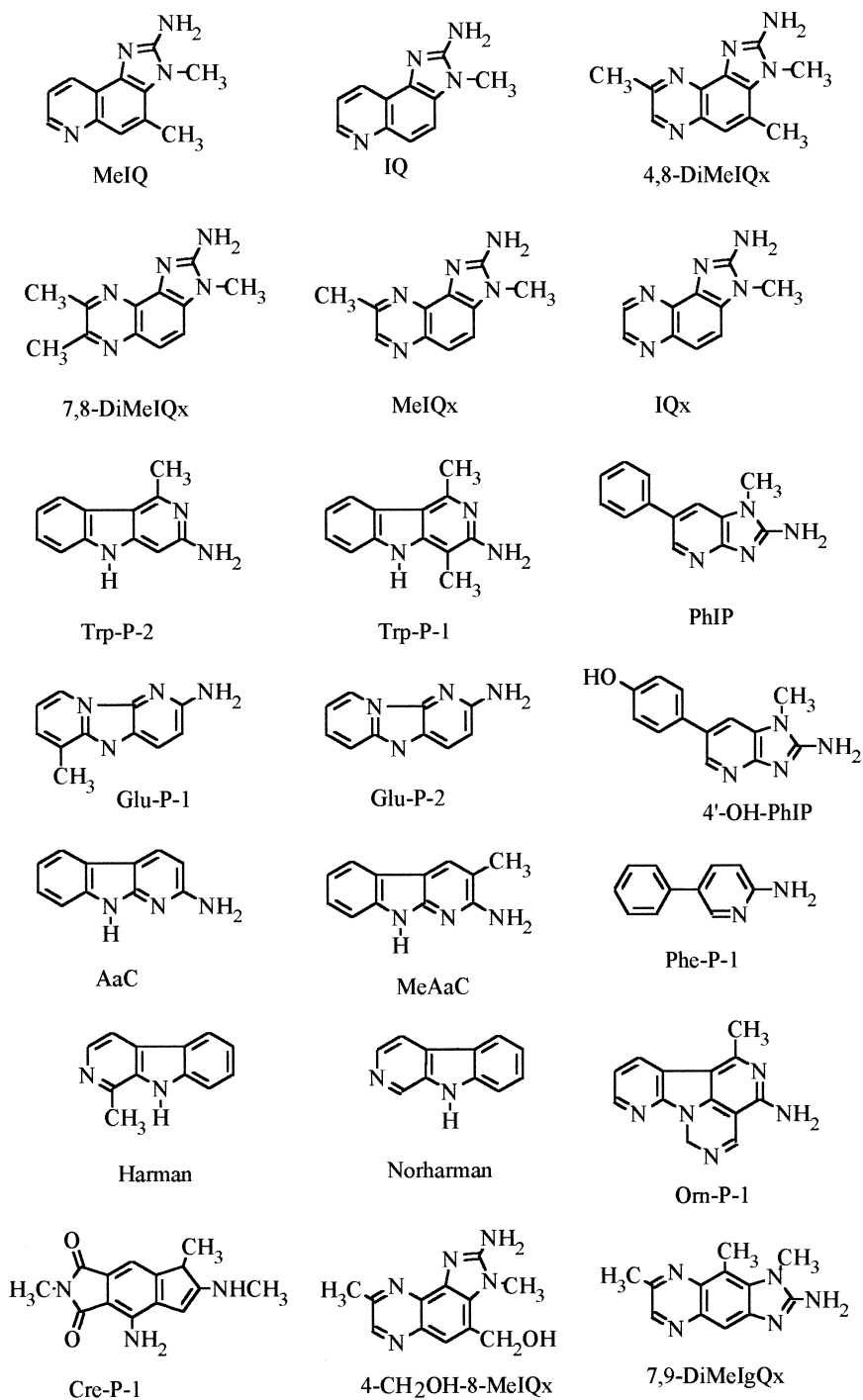


Fig. 1. Structures of mutagenic amines and comutagens Harman and Norharman.

of liquid–liquid [15,16] or solid-phase purification techniques can be found in the literature [5,17,18], followed mainly by chromatographic techniques [high-performance liquid chromatography (HPLC)–UV [19,20], HPLC–fluorescence [19,21], HPLC–electrochemical detection (ED) [22,23], HPLC–mass spectrometry (MS) [24,25], gas chromatography (GC)–MS [26]], capillary electrophoresis [27,28] or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [29]. The sample matrix greatly influences the clean-up efficiency and many peaks with the same retention times as those of HAAs are often present in the chromatograms of final extracts. Consequently, great efforts are needed to improve existing procedures of clean-up and preconcentration, which usually include extensive fractionations in multiple steps. As shown in Report EUR 17652 EN of BCR [30], an inter-comparison exercise on the determination of HAAs in a commercial beef extract, the complexity of extraction methods led to highly dispersed analytical results being obtained. This indicates a lack of accuracy, which could be attributable to both poor repeatability and the low level of recoveries. The study has also revealed that great discrepancies appeared between laboratories and also between-day within the same laboratory.

This study seeks to compare three liquid–solid extraction methods described for the analysis of conventional meat extracts [31–33] to establish the suitability of each method. Moreover, on the basis of existing solid-phase extraction (SPE) methods, different eluting solvents and cation exchangers were studied to improve extraction efficiencies and to achieve a high degree of accuracy and precision in the analysis of HAAs. Thus, an additional method was tested. These four methods were applied to a lyophilized meat extract that could be considered a candidate reference material. The analysis of the purified extracts was performed by HPLC with UV photodiode-array detection, and the results obtained from different clean-up procedures were discussed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Solvents and chemicals used were HPLC or

analytical grade, and the water was purified in a Culligan Ultrapure system (Barcelona, Spain). All the solutions were passed through a 0.45- μm filter before injection into the HPLC system.

The compounds studied were 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), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (7,8-DiMeIQx), 2-amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (TriMeIQx), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 2-amino-6-methylpyridopyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), 2-aminodipyridopyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-2), 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (A α C) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada), and 1-methyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (Harman) and 9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (Norharman), which were from Aldrich (Steinheim, Germany). Stock standard solutions of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in methanol were prepared and used for further dilutions. TriMeIQx and 7,8-DiMeIQx were used as internal standards (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ methanolic solution).

Diatomaceous earth extraction cartridges (Extrelut-20) and refill material were provided by Merck (Darmstadt, Germany); PRS (500 mg), C₁₈ (100 mg and 500 mg) and strong cation-exchange (SCX) (100 mg) Bond Elut cartridges, as well as coupling pieces and stopcocks were from Varian Associates (Harbor City, USA). These cartridges were preconditioned with dichloromethane (7 ml) for PRS and methanol (5 ml) and water (5 ml) for C₁₈. A commercial meat extract, Bovril (CPC, Esher, UK) was obtained from a local market.

2.2. Instruments

Reversed-phase HPLC analyses were performed by means of a Pharmacia LKB HPLC System (Uppsala, Sweden) equipped with a high pressure mixer and a Rheodyne 7125 Injector (Cotati, CA, USA). Detection and confirmation of the peaks in the sample were carried out with a Beckman System Gold 168 (Fullerton, CA, USA) photodiode-array

UV detector. Spectra of peaks were recorded from 200 to 300 nm. Peak identification was achieved by comparing the peaks' UV absorbance spectrum with library spectra acquired from standard solutions.

The amines were separated using a TSK-Gel ODS 80T column (5 μm , 25.0 \times 4.6 mm I.D.) (Toso Haas, Stuttgart, Germany) and a Supelguard LC-8-DB pre-column (Supelco, Gland, Switzerland).

A Supelco Visiprep and a Visidry SPE vacuum manifold (Supelco, Gland, Switzerland) were used for manipulations with SPE cartridges and solvent evaporation, respectively.

2.3. Chromatographic conditions

Binary mobile phase at a flow-rate of 1 ml min⁻¹ was used to separate the analytes. Solvent A: 0.01 M triethylamine in water adjusted with phosphoric acid to pH 3.3; solvent B: acetonitrile. The gradient program was: 5–23% B in A, 0–18 min; 23% B in A, 18–25 min; 23–55% B in A, 25–33 min.

2.4. Sample preparation

A commercial meat extract (Bovril) was suspended in water and the mixture was homogenized by stirring with a peel mixer. Afterwards the material was spiked with measured amounts of IQ (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$), MeIQx (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), 4,8-DiMeIQx (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and PhIP (30 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and the mixture was stirred for 2 h more. Finally, the extract was conveniently lyophilized, ground and sieved.

2.5. Solid-phase extraction procedures

Different SPE procedures were compared to establish the best conditions for the determination of HAAs in beef extracts. Most of the procedures were based on the method initially described by Gross [32] (method A), and later modified by several authors [31,33,34] (methods B and C). All include the use of various adsorbents to give a final extract containing the HAAs with minor interferences. In this paper another modification is proposed as method D. Fig. 2 outlines the different procedures. In some cases, with every new batch of solid adsorbent cartridges, specially PRS, the elution volume and/or

solvent composition had to be adjusted for maximum recovery of HAAs.

2.5.1. Method A

A 2-g beef extract sample or an appropriate standard mixture aliquot was dissolved in 12 ml 1 M NaOH; after shaking until homogenization for 3 h, with sonication if necessary. The alkaline solution was mixed with Extrelut refill material (15 g) and used to fill an empty Extrelut column that was coupled to a Bond-Elut PRS column. The analytes adsorbed on the Extrelut packing were extracted using dichloromethane, which was introduced into the PRS (500 mg) column coupled on-line, and the extraction was stopped when 75 ml had passed through the coupling. The Extrelut column was discarded, and the PRS column was dried and successively rinsed with 6 ml 0.01 M HCl, 15 ml methanol–0.1 M HCl (4:6, v/v) and 2 ml water. The PRS column was then coupled to a C₁₈ (100 mg) column. This tandem was eluted with 20 ml of 0.5 M ammonium acetate at pH 8.0. The adsorbed HAAs were then eluted from C₁₈, after rinsing with 5 ml water, using 0.8 ml of methanol–ammonia (9:1, v/v). The solvent was evaporated with a stream of nitrogen and the analytes were redissolved with 50 μl of the internal standard in methanol. The final extract was analysed using the HPLC–DAD method described earlier.

2.5.2. Method B

This procedure was performed as in method A, but in this case the PRS column was rinsed with three different solvents: 6 ml 0.01 M HCl, 15 ml methanol–0.1 M HCl (6:4, v/v) and 2 ml water. These fractions, which contained the less polar HAAs, were collected and neutralized with 500 μl ammonia, the neutral solution was diluted with 25 ml water and passed through a C₁₈ (500 mg) column. The amines retained were eluted, after rinsing with 2 ml water, using 1.4 ml of methanol–ammonia (9:1, v/v) providing the named *less-polar extract* (B1). The PRS column was then coupled to a C₁₈ column and treated as in method A, which provided the named *polar extract* (B2). Finally the two extracts obtained were separately processed, as in method A, giving the methanolic solutions for analysis.

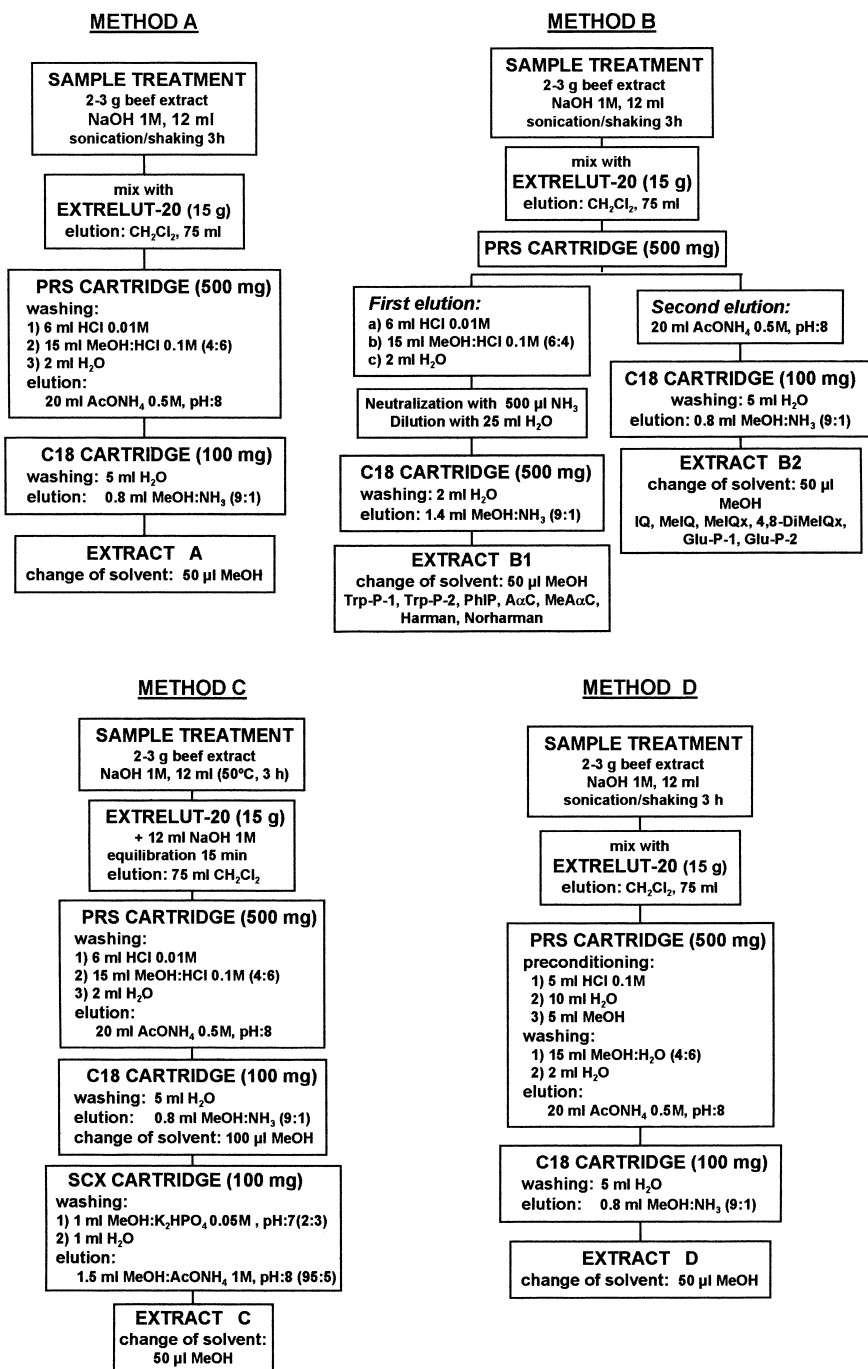


Fig. 2. Solid-phase extractions procedures.

2.5.3. Method C

In this procedure the alkaline solution was digested at 50°C for 90 min as the original reference recommended, and the option without heating was checked as well. Unlike method A, the final extract was additionally purified using a propylbenzylsulphonic column [strong cation-exchange (SCX)]. The methanolic solution (100 µl), without internal standard, was introduced into SCX column (100 mg). After rinsing with 1 ml methanol–0.05 M K₂HPO₄ at pH 7.0 (2:3, v/v) and 1 ml water, the adsorbed HAAs were eluted with 1.5 ml of methanol–1 M ammonium acetate at pH 8.0 (95:5, v/v). Finally, the solvent was evaporated with a stream of nitrogen and the analytes were redissolved with 50 µl of the internal standard in methanol. The final extract was analysed using the HPLC–DAD method described earlier.

2.5.4. Method D

In contrast with method A, the PRS column was preconditioned with 5 ml 0.1 M HCl, 10 ml water and 5 ml methanol, moreover, this column was rinsed with 15 ml methanol–water (4:6, v/v) instead of the methanol–0.1 M HCl (4:6, v/v) solution.

3. Results and discussion

The aim of this study was to compare different solid phase extraction methods for the determination of heterocyclic aromatic amines in complex matrices such as meat extracts. Recoveries of HAAs using A, B, C and D clean-up procedures were obtained by processing both a standard mixture solution of HAAs in methanol and the contaminated meat extract described above.

The HAAs were arranged in two groups, the polar and less-polar amines, on the basis of their behaviour in the chromatographic separation. The polar amines group included to Glu-P-1, Glu-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx and 4,8-DiMeIQx, and the less-polar amines were Trp-P-1, Trp-P-2, PhIP, AαC, H and NH. The recoveries corresponding to each clean-up procedure were calculated using the standard addition method performed in duplicate at three addition levels. The spiked samples were prepared by addition of a standard mixture solution containing about 80, 160

and 320 ng of each HAA at the beginning of the process, when 10 ml of NaOH was added. Recoveries were estimated from these additions with HPLC–DAD system. These values were calculated from the slope of the regression line performed for the amount added versus the amount measured. The recovery values for the most polar of the amines, obtained using a standard mixture solution, are given in Table 1; methods A, B and D provided similar recovery values ranging between 60% to 90% with confidence intervals of about 10%. Method C, proposed by Perfetti, gave the lowest recoveries especially for Glu-P-1 and Glu-P-2, the latter not being detected in the final extract.

In relation to the less polar amines, a different behaviour was observed between methods (Table 1). They can be paired in two groups; methods B and D gave similar recoveries that were good enough for quantification, while methods A, Gross and C, Perfetti, gave poor results for all less-polar amines because none of them could be detected in the final extracts except PhIP when using method A, where the recovery was 15%.

When the SPE procedures were applied to a complex matrix, the meat extract, the polar amines presented a similar behaviour as with methanolic standard mixture solution. Methods A, B and D gave the best recoveries for all amines except IQ for method D, in this case a matrix interference coeluted with the analyte impeded quantification. In method C, two temperatures (room temperature and 50°C) were used for solving the sample in sodium hydroxide solution. In both cases, at 25 and at 50°C, recoveries were lower than for other procedures, and Glu-P-1 and Glu-P-2 were lost as had occurred with methanolic solutions. Nevertheless, extract C provided the more efficient clean up as can be seen in Fig. 3, where the chromatograms corresponding to extracts A and C are given. Comparing both chromatograms, extract C was cleaner, in particular in the zone where IQ appears. This could be due to the additional clean-up step using SCX cartridges, in fact, several peaks in extract A approach to that of the analyte, reducing the robustness of the separation.

The recoveries of the less-polar amines in a complex matrix, the meat extract, agreed with those obtained for a single matrix, the methanol solution,

Table 1
Analyte recoveries obtained by processing a standard mixture solution of HAAs in methanol^a

Compound	Method A	Method B	Method C	Method D
Glu-P-2	83.5 (4.2)	75.5 (5.0)	n.r.	87.2 (3.4)
IQ	71.8 (2.7)	69.7 (5.7)	28 (12)	74.89 (0.74)
MeIQ	63 (10)	56.4 (8.6)	47 (11)	70.3 (1.3)
Glu-P-1	87.0 (4.6)	84.3 (8.2)	3.38 (0.67)	90.6 (4.4)
MeIQx	87.17 (0.21)	77.2 (4.8)	37.9 (6.3)	85.6 (3.4)
7,8-DiMeIQx	82.3 (2.3)	71.0 (4.6)	49.7 (9.6)	82.5 (2.5)
4,8-DiMeIQx	82.1 (1.9)	72.3 (2.9)	53 (10)	82.0 (1.5)
Norharman	n.r. ^b	75.2 (7.6)	n.r.	74.7 (5.0)
Harman	n.r.	83.2 (4.4)	n.r.	55 (13)
Trp-P-2	n.r.	72.5 (8.2)	n.r.	46.6 (8.8)
PhIP	16.9 (3.2)	70.0 (4.4)	n.r.	70.1 (2.7)
Trp-P-1	n.r.	72.8 (6.3)	n.r.	26.2 (3.8)
A α C	n.r.	57.9 (2.3)	n.r.	83.8 (3.6)

^a Confidence intervals ($n=8$, $\alpha=0.05$) are expressed in parentheses.

^b n.r.=Not recovered.

though only methods B and D provided good results. Recovery values ranged between 45 and 90%, and their confidence intervals were less than 10%. When using methods A and C the less-polar amines were completely lost in the clean-up process. Fig. 4 shows the chromatograms obtained for extracts B and D. Method B provided two final extracts containing polar and less-polar amines respectively. In contrast, method D provided only a single extract. For polar amines, a cleaner extract was obtained using method B and, as can be seen, two major interferences that appeared in the less polar extract were eliminated in the clean-up procedure. One of these interferences prevented the determination of IQ with method D. For the less-polar amines a similar clean-up was achieved with both methods except for A α C for which higher purification was obtained with method D due to the washing of the PRS cartridge before extraction. This method had the advantage of being faster (analysis time was reduced by 40%) and would seem suitable for the screening of unknown samples.

In Table 2 the results obtained in the analysis of the meat extract using methods A, B, C and D are shown. For comparative purposes, the results obtained using method B and MS-electrospray ionization (ESI) [24] and MS-atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [35] and our results from the intercomparison exercise [30] using ED are also included. As can be seen, the results were in good agreement for all the compounds and methods used

for clean-up, in addition the results agreed with those obtained using method B with different LC procedure and operator. Nevertheless, an interference prevented the analysis of IQ using method D, PhIP was not detected when methods A and C were used, and method C (Perfetti) gave higher standard deviations which might be related to the lower recoveries.

4. Conclusions

To date, procedures based on the Gross method are the most commonly applied to the sample treatment for HAA analysis. Most of these procedures lack in both the clean-up efficiency and the reproducibility of the results, therefore, much efforts are still necessary to improve them. Furthermore, parameters such as recovery depend, in a great extent, on the matrix of sample, thus, is very difficult to establish a general procedure for the analysis of HAAs. For these reasons, MS becomes a valuable tool being the most suitable to obtain reliable results in the analysis of complex matrices. However, in the routine analysis of known samples, the use of detection methods such as DAD can produce results good enough for quantitative purposes, provided that the method is previously validated.

In general, a compromise needs to be achieved between high recovery and clean-up efficiency. This depends greatly on the complexity of the sample

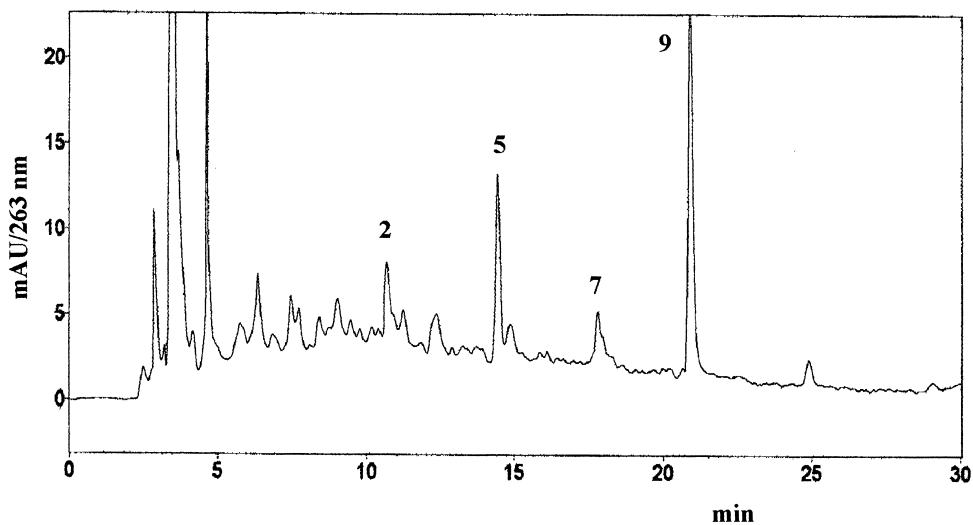
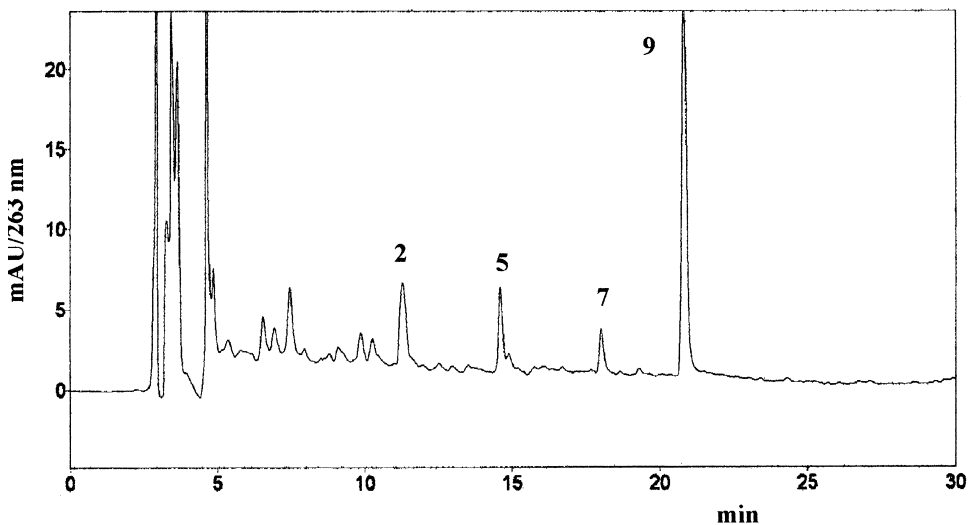
Method A**Method C**

Fig. 3. Chromatograms of the meat extract obtained with methods A and C. Peaks: 2=IQ; 5=MeIQx; 7=4,8-DiMeIQx; 9=TriMeIQx (I.S.).

matrix. In our tests, the best performance was obtained when using a clean-up procedure that combined Extrelut, PRS and C₁₈ cartridges, a selective elution of polar and less-polar HAAs from PRS

cartridge, as described in method B. This provided both high recoveries (60–90%) and a high degree of accuracy in the results, although this time-consuming procedure was not suitable for screening analysis.

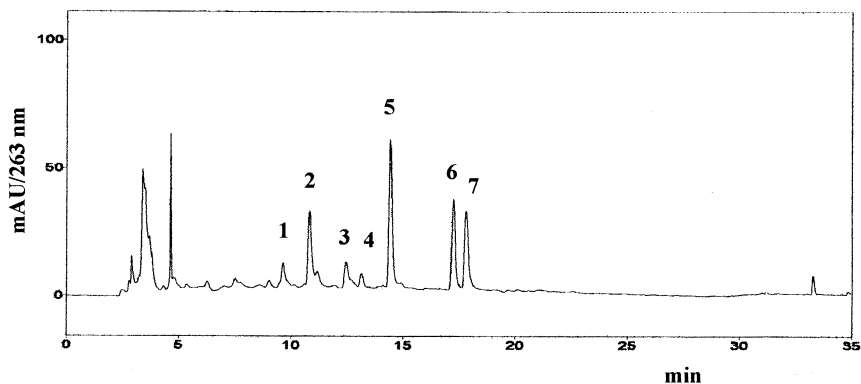
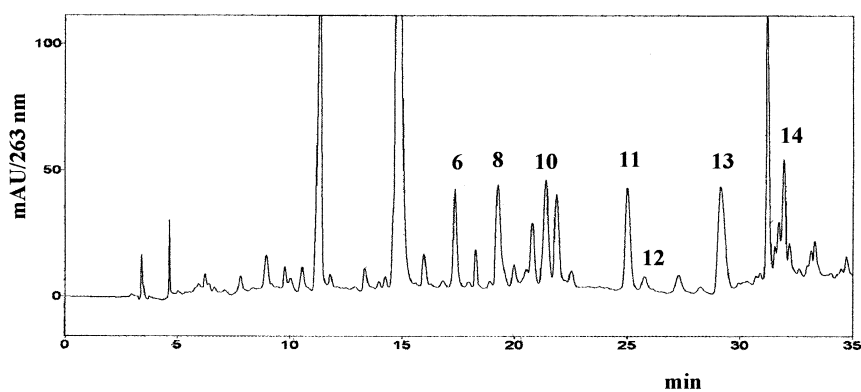
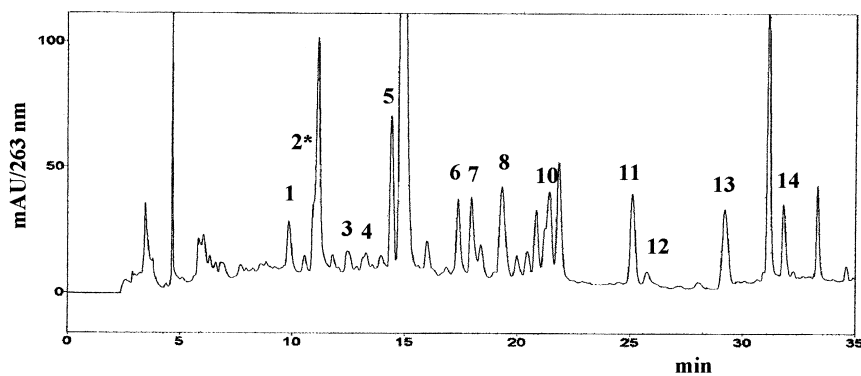
Method B, polar extract**Method B, less-polar extract****Method D**

Fig. 4. Chromatograms of the meat extract spiked at 100 ng/g of each amine obtained with methods B and D. Peaks: 1=Glu-P-2; 2=IQ; 3=MeIQ; 4=Glu-P-1; 5=MeIQx; 6=7,8-DiMeIQx (L.S.); 7=4,8-DiMeIQx; 8=Norharman; 10=Harman; 11=Trp-P-2; 12=PhIP; 13=Trp-P-1; 14=AαC. *=Non pure peak.

Table 2
Analytical results (ng g⁻¹) for the contaminated meat extract

Method	Compound			
	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	PhIP
A	29.6±9.9	23.5±10	11.1±6.9	–
B	29.7±8.8	41±14	14±6.1	38±12
B ^a	36±4.9	38±4.4	10±2.2	30±4.3
B ^b	40±4.8	41±3.6	12±2.1	29±5.0
B ^c	43±2.0	40±1.0	13±2.0	32±2.7
C, 50°C	40.5±6.4	18.4±8.6	6.7±5.2	–
D	–	33.4±2.5	8.9±5.8	28.8±9.2

^a LC-ES-MS.

^b LC-APCI-ES.

^c LC-ED.

The method proposed by Perfetti, method C, was the most efficient clean-up procedure for polar amines, although lower recoveries and higher standard deviations were obtained, moreover, Glu-P-1, Glu-P-2, and less-polar amines were not recovered. Method D gave acceptable results but some interferences might prevent quantitative determinations as was the case with IQ. Method B appeared to be the most consistent when analysing materials containing both polar and less-polar amines; nevertheless, method D proved to be a relatively faster procedure suitable for screening unknown samples. It should be emphasized that complex matrices such as processed flavors containing meat extracts may need further clean-up for a successful determination of HAAs. Furthermore, the reliability of different clean-up methods should also be considered in relation to the HPLC-detection system. Thus, for UV detection and in the determination of polar amines method C provided the cleanest extract; nevertheless, when more selective detection methods are used, such as mass spectrometry and electrochemical detection, procedures A, D and of course, B could be applied to obtain results good enough for quantitative purposes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the receipt of financial support from the C.I.C.Y.T. for research project ALI96-0863.

References

- [1] G.N. Wogan, *Environ. Health Perspect.* 98 (1992) 167.
- [2] H. Bartsch, C. Malaveille, M. Friesen, F.F. Kadlubar, P. Vineis, *Eur. J. Cancer* 29 (1993) 1199.
- [3] T. Sugimura, M. Nagao, K. Wakabayashi, *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 429.
- [4] D.W. Layton, K.T. Bogen, M.G. Knize, F.T. Hatch, V.M. Johnson, J.S. Felton, *Carcinogenesis* 16 (1995) 39.
- [5] R. Schwarzenbach, D. Gubler, *J. Chromatogr. A* 624 (1992) 491.
- [6] L.S. Jackson, W.A. Hargraves, W.H. Stroup, G.W. Diachenko, *Mutation Res.* 320 (1994) 113.
- [7] E. Richling, C. Decker, D. Häring, M. Herderich, P. Schreier, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 71.
- [8] H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 121.
- [9] T. Sugimura, *Mutation Res.* 376 (1997) 211.
- [10] C.D. Davis, E.J. Dacquel, H.A.J. Schut, S.S. Thorgeirsson, E.G. Snyderwine, *Mutation Res.* 356 (1996) 287.
- [11] H. Ohgaki, S. Takayama, T. Sugimura, *Mutation Res.* 259 (1991) 399.
- [12] J.S. Felton, M.A. Malfatti, M.G. Knize, C.P. Salmon, *Mutation Res.* 376 (1997) 37.
- [13] R. Sinha, N. Rothman, *Mutation Res.* 376 (1997) 195.
- [14] M. Nagao, K. Wakabayashi, T. Ushijima, M. Toyota, Y. Totsuka, T. Sugimura, *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 497.
- [15] H. Lee, S.J. Tsai, *Food Chem. Toxicol.* 29 (1991) 517.
- [16] K.R. Grose, J.L. Grant, L.F. Bjeldanes, B.D. Andresen, S.K. Healy, P.R. Lewis, J.S. Felton, F.T. Hatch, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 201.
- [17] H.P. Thiébaud, M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, D.P. Hsieh, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 821.
- [18] G.A. Gross, G. Philipposian, H.U. Aeschbacher, *Carcinogenesis* 10 (1989) 1175.
- [19] M.G. Knize, C.P. Salmon, E.C. Hopmans, J.S. Felton, *J. Chromatogr. A* 763 (1997) 179.
- [20] M.G. Knize, R. Sinha, N. Rothman, E.D. Brown, C.P. Salmon, O.A. Levander, P.L. Cunningham, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 545.
- [21] Y. Kanai, O. Wada, S. Manabe, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1001.
- [22] M.M.C. Van Dyck, B. Rollman, C. De Meester, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 377.
- [23] S.M. Billedeau, M.S. Bryant, C.L. Holder, *LC-GC* 4 (1991) 38.
- [24] M.T. Galceran, E. Moyano, L. Puignou, P. Pais, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 185.
- [25] R.J. Turesky, H. Bur, T. Huynh-Ba, H.U. Aeschbacher, H. Milon, *Food Chem. Toxicol.* 26 (1988) 501.
- [26] S. Murray, A.M. Lynch, M.G. Knize, N.J. Gooderham, *J. Chromatogr. A* 616 (1993) 211.
- [27] J.C. Olsson, A. Dyremark, B. Karlberg, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 329.
- [28] J. Wu, M.-K. Wong, H.-K. Lee, B.-L. Lee, C.-Y. Shi, C.-N. Ong, *Food Addit. Contam.* 13 (1996) 851.

- [29] M. Vanderlaan, B.E. Watkins, M. Hwuang, M.G. Knize, J.S. Felton, *Carcinogenesis* 10 (1989) 2215.
- [30] C. De Meester, M.T. Galceran, M. Rabache, BCR Information, Report EUR 17652 EN, 1997.
- [31] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 203.
- [32] G.A. Gross, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1597.
- [33] G.A. Perfetti, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 813.
- [34] G.A. Gross, A. Grüter, *J. Chromatogr. A* 592 (1992) 271.
- [35] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 207.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 880 (2000) 101–112

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract

F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou*, M.T. Galceran

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

Abstract

Heterocyclic amines are a group of potent mutagenic compounds which are generated when muscle meat is cooked. Since they are possible human carcinogens, these mutagens have received considerable attention in recent years, and several analytical techniques have been developed for their quantification. Although the purification step is one of the most important, there are a great number of variables influencing the recovery of the amines, especially when real samples are analysed. In this work we studied the influence of sample spiking mode on the recoveries. Furthermore, on the basis of a previously developed clean-up method, the effect of changing commercial source and structure of the sorbents used in two solid-phase extraction steps was examined. This purification method was applied to the quantification of the heterocyclic aromatic amines present in a lyophilised meat extract by means of liquid chromatography–mass spectrometry. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Solid-phase extraction; Food analysis; Meat; Amines, heterocyclic aromatic

1. Introduction

Nowadays it is widely accepted that diet is one of the most important factors in the origination of cancer in the human population [1]. In 1977, Nagao et al. found important mutagenic activity in smoke condensate and charred parts of broiled fish and beef [2]. Since then, more than 20 highly mutagenic compounds, grouped under the denomination of heterocyclic amines (HAs), have been isolated mainly from various protein-rich heated foods, such as cooked meat and fish [3,4] or flavors [5]. Furthermore, some of these mutagens have been found in other matrices, including cigarette smoke condensate [6], wine [7] and environmental samples [8].

Besides being among the most potent mutagenic/genotoxic substances ever tested by both in vitro and in vivo studies [9,10], the HAs examined have been shown to be carcinogenic in long-term animal experiments developed with rodents and primates [11,12]. Moreover, several epidemiological studies suggest that consumption of meat and cooking procedures are related to an increased risk of some types of human cancer [13,14].

On the basis of this evidence, it seems possible that HAs are potential human carcinogens. To determine the importance of the consumption of these compounds for human health, it is essential to quantify the amounts present in foods by means of reliable and quantitative methods, which is not easy due to the low level of concentration of the heterocyclic amines (0.1–50 ng/g) and the high complexity of the matrix. Various purification meth-

*Corresponding author. Fax: +34-93-402-1233.

E-mail address: puignou@zeus.qui.ub.es (L. Puignou)

ods based on liquid–liquid extraction [15], extraction with blue cotton [16], solid-phase extraction (SPE) with disposable columns [17,18] or immunoaffinity purification [19] can be found in the literature, mainly followed by different separation and determination techniques such as gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [20,21], gas chromatography with nitrogen–phosphorus selective detection (GC–NPD) [22], liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) [23,24], liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) [25], liquid chromatography with electrochemical (LC–ED) [26,27], ultraviolet (LC–UV) [28,29] and/or fluorescence [30,31] detection system, capillary electrophoresis–mass spectrometry (CE–MS) [32], capillary electrophoresis with UV detection (CE–UV) [33,34] or micellar electrokinetic chromatography with electrochemical detection (MEKC–ED) [35].

Since the degree of selectivity in the detection depends on the clean-up efficiency of the sample preparation procedure, the use of detectors with poor specificity, such as UV, requires exhaustive purification process [36,37], but frequently a decrease of analyte recovery and thus of accuracy of the results occurs. Therefore, more selective detection systems such as MS are suitable when higher recoveries but less exhaustive clean-up are obtained. In this work, we applied a simplified purification procedure described previously [38,39] to the analysis of the HAs present in a lyophilised meat extract using MS detection. Some factors affecting the extraction efficiency, including the spiking mode and the change of sorbent trademark and structure in the PRS and C_{18} steps, were studied in order to achieve maximum recoveries and optimal clean-up efficiency, which would provide suitable limits of detection in the MS analysis.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The solvents and chemicals used were HPLC or analytical grade, and the water was purified in an Elix-Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). All the solutions were passed through a 0.45- μ m filter before injection into the HPLC system.

The compounds studied were 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), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (7,8-DiMeIQx), 2-amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (TriMeIQx), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2), 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), 2-aminodipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-2), 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (A α C), 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA α C) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada), and 1-methyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (harman) and 9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (norharman), which were from Sigma (Steinheim, Germany). Stock standard solutions of 100 μ g ml⁻¹ in methanol were prepared and used for further dilution. TriMeIQx was used as internal standard (2 μ g ml⁻¹ methanolic solution).

Diatomaceous earth extraction cartridges (Extrelut-20) and refill material were provided by Merck (Darmstadt, Germany); PRS sodium form (500 mg) and endcapped C_{18} (100 mg) Bond Elut cartridges were from Varian (Harbor City, USA), PRS hydrogen form (200 and 500 mg) and endcapped, non-endcapped and monofunctional C_{18} (100 mg) Isolute cartridges were from IST (Hengoed, Mid-Glamorgan, UK). Coupling pieces and stopcocks were from Varian. PRS cartridges were preconditioned depending on the case (Table 1), and C_{18} cartridges were preconditioned with methanol (5 ml) and water (5 ml). A lyophilised meat extract was prepared from a commercial meat extract (Bovril) which was previously spiked with IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx and PhIP as described in Refs. [38,40].

Caffeine, MRFA (L–Met–Arg–Phe–Ala acetate·H₂O) and Ultramark 1621 (PEG mixture) were purchased from Sigma.

2.2. Instruments

LC analyses were performed by means of a Waters 2690 separations module (Milford, MA, USA), and a

Table 1
Scheme of the methods and characteristics of the cartridges

Method	PRS cartridge			C ₁₈ cartridge		
	Trademark	Characteristics	Preconditioning	Trademark	Characteristics	Preconditioning
1	Varian	Sodium form, non-encapped, 500 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 0.18 mequiv./g ion-exchange capacity	5 ml 0.1 M HCl 10 ml water 5 ml MeOH dried 7 ml DCM	Varian	Trifunctional, encapped, 100 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 2.1 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water
2	IST	Hydrogen form, non-encapped, 200 mg, 50- μ m particles, 60 Å porosity, 0.34 mequiv./g ion-exchange capacity	7 ml DCM	Varian	Trifunctional, encapped, 100 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 2.1 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water
3	IST	Hydrogen form, non-encapped, 500 mg, 50- μ m particles, 60 Å porosity, 0.34 mequiv./g ion-exchange capacity	7 ml DCM	Varian	Trifunctional, encapped, 100 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 2.1 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water
4	IST	Hydrogen form, non-encapped, 500 mg, 50- μ m particles, 60 Å porosity, 0.34 mequiv./g ion-exchange capacity	5 ml 0.1 M HCl 10 ml water 5 ml MeOH dried 7 ml DCM	Varian	Trifunctional, encapped, 100 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 2.1 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water
5	Varian	Sodium form, non-encapped, 500 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 0.18 mequiv./g ion-exchange capacity	5 ml 0.1 M HCl 10 ml water 5 ml MeOH dried 7 ml DCM	IST	Monofunctional, non-encapped, 100 mg, 50- μ m particles, 125 Å porosity, 1.9 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water
6	Varian	Sodium form, non-encapped, 500 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 0.18 mequiv./g ion-exchange capacity	5 ml 0.1 M HCl 10 ml water 5 ml MeOH dried 7 ml DCM	IST	Trifunctional, non-encapped, 100 mg, 50- μ m particles, 60 Å porosity, 1.5 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water
7	Varian	Sodium form, non-encapped, 500 mg, 40- μ m particles, 60 Å porosity, 0.18 mequiv./g ion-exchange capacity	5 ml 0.1 M HCl 10 ml water 5 ml MeOH dried 7 ml DCM	IST	Trifunctional, encapped, 100 mg, 50- μ m particles, 60 Å porosity, 1.5 μ mol/m ² surface coverage	5 ml MeOH 5 ml water

Waters 2487 dual wavelength absorbance detector was used to record on-line UV chromatograms at 263 nm for qualitative purposes.

Determination and identification of the peaks in the sample were carried out with an LCQ (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) provided with an atmospheric pressure chemical ionisation interface and an ion-trap mass analyser. Optimal source working conditions to record positive ions were as follows: discharge voltage was 5 kV; heated capillary temperature was 150°C, and that of the vaporiser 450°C; nitrogen was used as drying gas at 72 l h⁻¹ and as nebulizing gas at 360 l h⁻¹. For data acquisition in

full scan mode, the mass spectrometer operated over a range of m/z 150.0–250.0 in centroid mode with a maximum injection time of 1000 ms, 1 microscan each cycle, automatic gain control in on mode and inject waveform off.

Efficiency of ion transference from source to the ion trap was automatically optimised by infusing methanolic solutions of IQ, 4,8-DiMeIQx and Trp-P-1. To prevent MS contamination when running LC-MS, a divert valve was used. MS calibration was carried out with the infusion of a mixture containing caffeine, MRFA and Ultramark 1621 into the APCI source.

A rotating shaker Rotary Mixer 34526 (Breda Scientific, Breda, Netherlands) was used for the sample homogenisation in the alkaline solution, and a Supelco Visiprep and a Visidry SPE vacuum manifold (Supelco, Gland, Switzerland) were used for manipulations with SPE cartridges and solvent evaporation, respectively.

2.3. Sample preparation

A previously described purification method [38] was used to extract analytes from a lyophilised meat extract. Briefly, 1 g beef extract sample was homogenised in 12 ml 1 M NaOH with sonication, and the suspension was then shaken for 3 h. The alkaline solution was mixed with Extrelut refill material (14 g) and used to fill an empty Extrelut column. According to the selected SPE method (Table 1), a PRS column was preconditioned, and then coupled on-line to the Extrelut column. To extract the analytes from diatomaceous earth, 75 ml dichloromethane were passed through the tandem; the PRS cartridge was then dried and successively rinsed with 15 ml methanol–water (4:6, v/v) and 2 ml water. The cationic exchanger column was then coupled to the corresponding C_{18} column (see Table 1), and this tandem was eluted with 20 ml of 0.5 M ammonium acetate, pH 8.0. The sorbed HAs were finally eluted from C_{18} , after rinsing with 5 ml water, using 0.8 ml of methanol–ammonia (9:1, v/v). The solvent was gently evaporated under a stream of nitrogen and the analytes were redissolved in 50 μ l of the internal standard in methanol. The final extract was analysed using the LC–MS method described in Section 2.4.

Quantification and recovery calculation of the amines in the beef extract was carried out by standard addition method. The meat extract was spiked with all the analysed compounds at three different levels (80, 160 and 320 ng g⁻¹) using the corresponding amount of a methanolic solution of the analytes, which was directly added to the sample. The solvent was allowed to evaporate for 1 h before processing the sample extraction step.

2.4. Chromatographic conditions

The amines were separated by means of reversed-

phase LC using a TSK-Gel ODS 80T column (25.0 × 4.6 mm I.D., 5 μ m) (TosoHaas, Stuttgart, Germany) equipped with a Supelguard LC-8-DB precolumn (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Optimal separation was achieved with a ternary mobile phase at a flow-rate of 1 ml min⁻¹. Solvent A: 30 mM formic acid in water adjusted with ammonia solution to pH 3.25; solvent B: 30 mM formic acid in water adjusted with ammonia solution to pH 3.7; solvent C: acetonitrile. The gradient program was: 5–23% C in A, 0–18 min; 23% C in A, 18–21 min; 23% C in B, 21–25 min; 23–60% C in B, 25–33 min; 60% C in B, 33–40 min; return to the initial conditions, 40–50 min; 5 min post-run delay. In all cases the amount injected was 15 μ l.

3. Results and discussion

3.1. Sample spiking

Extraction procedures are evaluated on the recovery achieved. Before the study on the different SPE cartridges, two important parameters influencing the recovery of the analytes were studied to ensure the accuracy of the results. The first was the time necessary to achieve a complete release of HAs from matrix by means of the initial alkaline treatment, and the second was the optimal spiking time, i.e. the time of contact between spiked analytes and sample, which is necessary to reproduce binding effects that occur in the case of native analytes. In each experiment, recoveries of all the analytes were calculated as described in Section 2, using Method 1 as extraction procedure (see Table 1).

To check the influence of the shaking time in the initial alkaline treatment, once the sample was homogenised in the sodium hydroxide solution, several periods (1, 3, 6 and 12 h) were studied using a spiking time of 24 h in all cases. Slightly lower recoveries were obtained for 1 h, and no significant differences were found between 3 and 12 h. Therefore, 3 h was fixed as the optimal shaking time. In the case of the contact time study, the periods tested were 1, 2, 6 and 24 h. In all cases, the shaking time for the dissolution step with 1 M NaOH was fixed at 3 h. Since no significant differences were observed between the recovery of each HA obtained at

different spiking times, 1 h was established as sufficient.

This study showed that both native and spiked analytes did not present differences in the extraction efficiency, which was quantitative with the treatment applied. This made standard addition a suitable method to determine extraction percentages without overestimation of the recoveries.

3.2. Efficiency of the clean-up and recoveries

The tandem extraction method chosen as reference, named as Method 1 in Table 1, is based on the use of Bond Elut PRS, preconditioned with diluted acid, and endcapped tridimensional Bond Elut C₁₈, both purchased from Varian [38]. The influence of the counter-ion in the ion-exchange sorbent was studied using the Bond Elut PRS in its original form, which presents sodium as a counter-ion [41], and alternatively the same sorbent was treated with an acidic preconditioning, thus hydrogen ions are introduced as counter-ions (Method 1). The effect derived from the use of different commercial sorbents was tested by changing either PRS or C₁₈ cartridges. In the case of the cationic exchanger, in addition to the Bond Elut PRS cartridge provided by Varian, two different Isolute PRS sorbents supplied by IST were tested maintaining the same Bond Elut C₁₈ sorbent in the tandem extraction. These Isolute PRS cartridges originally had a protonated form, i.e. with

hydrogen ion as counter-ion. When Isolute PRS 200 mg was used, the preconditioning step consisted only in washing with dichloromethane (Method 2). The influence of the acidic preconditioning was checked with Isolute PRS 500 mg, which was treated only with dichloromethane (Method 3), and also with 0.1 M HCL (Method 4), in order to evaluate the effect of the acidic preconditioning on the Isolute PRS features. A more detailed description of the preconditioning step is presented in Table 1.

On the other hand, three different Isolute C₁₈ cartridges provided by IST were compared to the Bond Elut C₁₈ proposed as reference. The first is monofunctional non-endcapped Isolute C₁₈ (Method 5), the second is non-endcapped tridimensional Isolute C₁₈ (Method 6) and the third is endcapped tridimensional Isolute C₁₈ (Method 7). In all cases, the C₁₈ cartridges were preconditioned with 5 ml MeOH followed by 5 ml water.

3.2.1. PRS cartridges

Results obtained in the study of PRS cartridges are given in Table 2, where the recoveries of the different analytes obtained with Methods 1–4 are detailed. For quinolines (IQ, MeIQ), α -carbolines (A α C, MeA α C) and δ -carbolines (Glu-P-1, Glu-P-2) slightly higher recoveries (58–94%) were obtained when using Isolute PRS 500 mg without acidic preconditioning (Method 3). However, this method gave low recoveries for Harman and the γ -carbolines

Table 2

Recovery values obtained with methods which differ in the PRS cartridge step and which use C₁₈ from Varian

Compound	Method 1		Method 2		Method 3		Method 4	
	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD
Glu-P-2	57.6	1.9	61.3	1.6	67.4	1.2	62.5	1.6
IQ	69.5	3.2	77.4	4.1	90.1	3.2	84.7	2.9
MeIQ	73.2	4.4	83.5	5.4	93.4	7.2	84.0	3.1
Glu-P-1	57.2	1.1	53.4	1.5	57.8	1.2	58.0	1.3
MeIQx	70.3	3.9	74.7	2.6	77.7	3.3	79.9	1.1
7,8-DiMeIQx	75.2	1.8	79.8	2.9	78.2	2.0	79.5	1.6
4,8-DiMeIQx	52.3	1.9	56.7	1.9	60.2	2.9	61.3	1.1
Norharman	54.1	3.3	59.4	1.8	61.9	4.4	55.1	2.3
Harman	49.6	5.2	49.2	2.1	34.9	8.3	23.5	5.0
Trp-P-2	49.8	1.0	54.6	3.3	15.6	1.9	10.1	2.5
PhIP	74.3	2.7	80.1	3.1	79.0	3.9	85.5	2.2
Trp-P-1	45.6	2.0	61.6	1.5	9.9	4.8	2.4	0.8
A α C	49.4	1.5	49.8	0.5	57.3	1.4	57.7	1.2
MeA α C	51.1	1.4	54.7	1.1	61.1	1.7	59.0	1.3

(Trp-P-1, Trp-P-2), ranging from 9 to 33%. The same effect, but more pronounced, was observed for these amines when the cationic exchanger was activated with diluted acid using Method 4 (3–24%). In general, good recoveries for all the compounds were obtained with the IST 200 mg cartridge (Method 2), achieving values above 50%.

Since PRS adsorbent is a strong cation exchanger, when normal-phase elution mode is used, HAs are retained through non-specific adsorption on the polar propylsulphonic acid (or sodium salt) residues as well as on the residual free silanol groups. The comparison of the results obtained with Bond Elut PRS [41] showed a different behaviour between sodium PRS and protonated PRS, achieving lower recoveries when the sodium form of the sorbent was used. This finding emphasizes the importance of the ion-exchange activation by introducing acidic groups in the propylsulphonate sorbent, which helps to the protonation of the amines and thus to the establishment of ionic interactions. On the other hand, the low recoveries obtained in the present study with protonated PRS (Method 3 and 4) could be attributed to a very strong retention of Trp-P-1, Trp-P-2 and H in the sorbent. The more efficient interaction between these HAs and the propylsulphonic group, which makes their reversed-phase elution difficult, could be explained by their higher basicity [42]. This hypothesis is supported by the fact that these analytes were recovered at higher levels (>45%) when

using Bond Elut PRS (Method 1), which has fewer functionalized points per area (Table 1), and, in the case of Method 2, because the mass of the sorbent is 200 instead of 500 mg.

When the UV chromatograms were observed, only minor differences in the degree of sample purification were found. For example, when the PRS cartridges were used with preconditioning, an interference for A α C occurred. Therefore, the most suitable PRS cartridge for the analysis of this beef extract would be Isolute PRS 200 mg (Method 2), since all the analytes were recovered at high percentages without requiring an acidic activation, which simplified the procedure and avoided the A α C interference with UV detection.

3.2.2. C₁₈ cartridges

In the study of C₁₈ sorbents, higher recoveries and acceptable standard deviations were obtained using the IST cartridges based on monofunctional Isolute C₁₈ (Method 5). As shown in Table 3, several HAs, specially quinolines (IQ, MeIQ), had recoveries more than 15% higher than those obtained with the reference method. Moreover, different selectivity was observed when changing the structure of the sorbent, as shown in Fig. 1, where the UV chromatograms obtained from a spiked meat extract using monofunctional Isolute C₁₈ (Method 5) and tridimensional Isolute C₁₈ (Method 6) are reproduced.

Table 3
Recovery values obtained with methods which use different C₁₈ cartridges combined with PRS from Varian

Compound	Method 1		Method 5		Method 6		Method 7	
	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD	Recovery (%)	SD
Glu-P-2	57.6	1.9	70.4	1.3	65.8	0.5	62.8	2.1
IQ	69.5	3.2	93.4	3.2	84.7	3.0	84.0	2.0
MeIQ	73.2	4.4	94.3	3.7	81.9	4.9	83.3	2.0
Glu-P-1	57.2	1.1	57.5	4.0	57.3	0.8	57.6	1.6
MeIQx	70.3	3.9	84.0	2.8	77.1	1.7	79.5	2.1
7,8-DiMeIQx	75.2	1.8	84.6	1.9	76.3	1.6	81.1	1.9
4,8-DiMeIQx	52.3	1.9	63.3	1.8	56.3	0.9	59.6	0.8
Norharman	54.1	3.3	67.7	4.3	60.6	1.6	55.6	2.2
Harman	49.6	5.2	60.0	8.6	50.4	4.1	48.7	3.5
Trp-P-2	49.8	1.0	59.7	1.7	50.2	2.3	54.2	1.5
PhIP	74.3	2.7	88.3	3.3	77.5	2.4	86.5	2.0
Trp-P-1	45.6	2.0	49.0	3.1	34.7	3.7	42.7	2.2
A α C	49.4	1.5	61.6	2.1	52.9	0.7	53.4	1.3
MeA α C	51.1	1.4	59.8	1.6	52.5	1.6	55.6	1.4

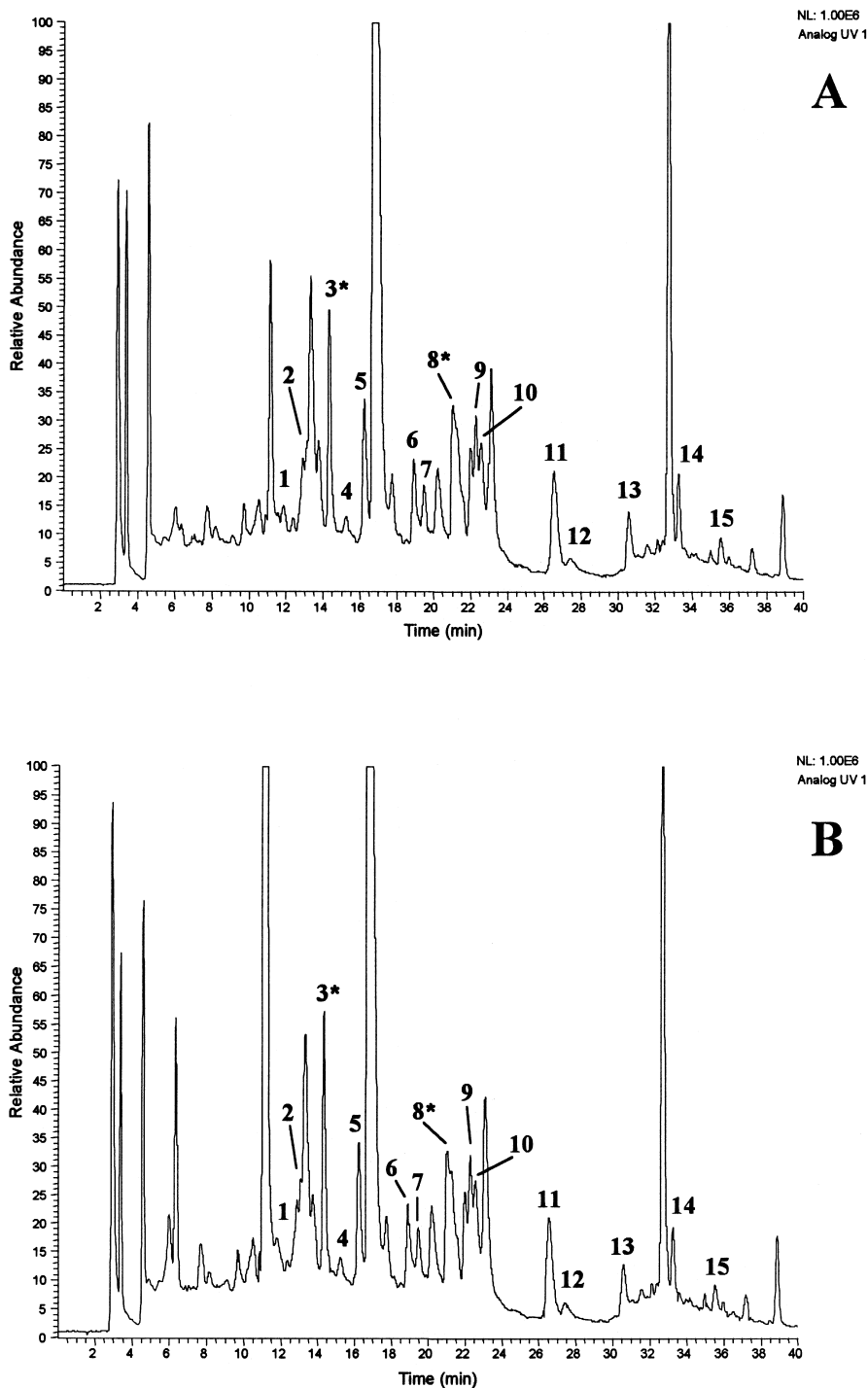


Fig. 1. Comparison of the UV chromatograms, acquired at $\lambda=263$ nm, obtained with Methods 5 (A) and 6 (B). The sample was spiked with 80 ng g^{-1} . Peaks: 1=Glu-P-2; 2=IQ; 3=MeIQ; 4=Glu-P-1; 5=MeIQx; 6=7,8-DiMeIQx; 7=4,8-DiMeIQx; 8=Norharman; 9=TriMeIQx (I.S.); 10=Harman; 11=Trp-P-2; 12=PhIP; 13=Trp-P-1; 14=A α C; 15=MeA α C. * = non-pure peak. Chromatographic conditions as in Section 2.

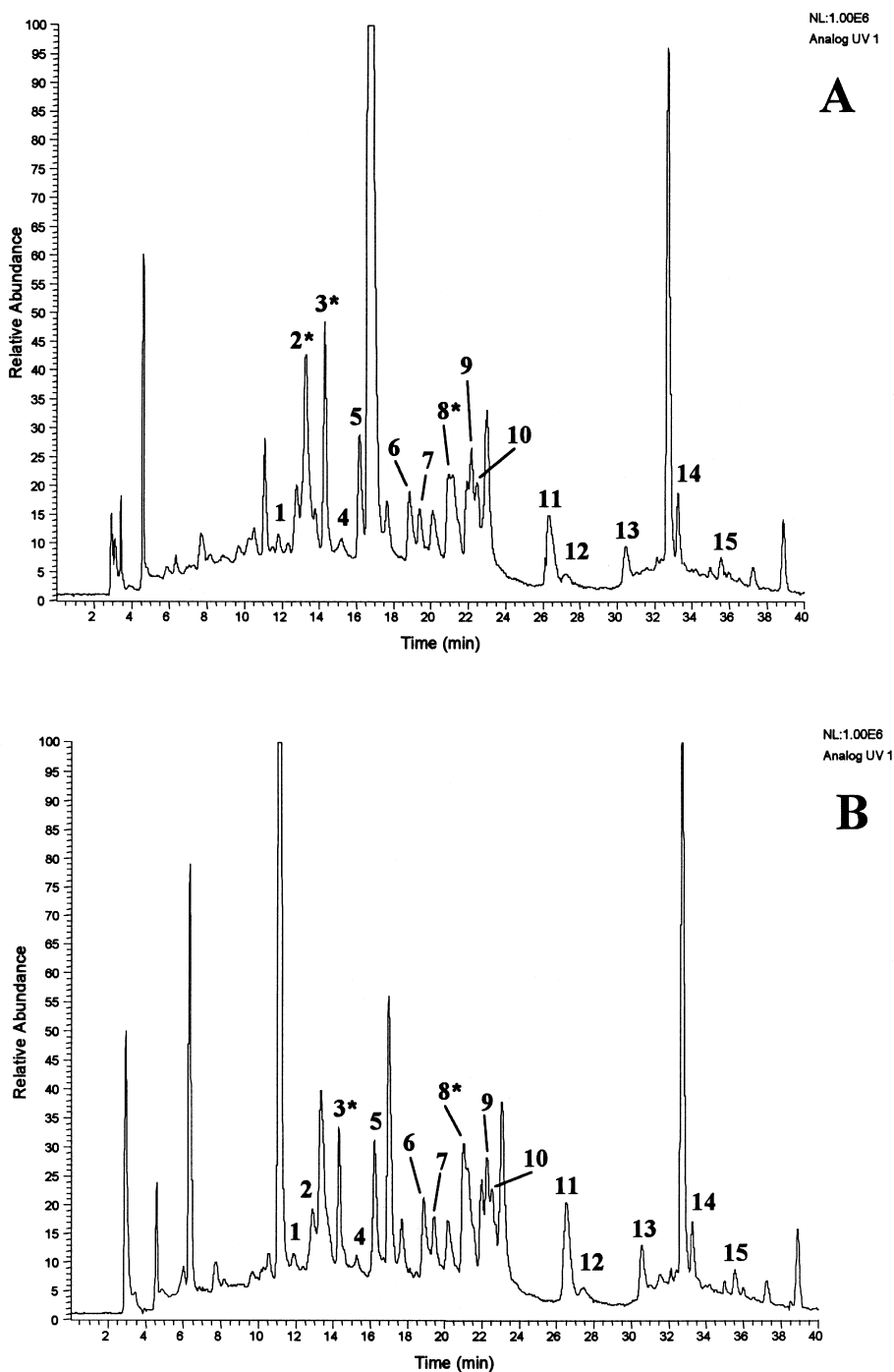


Fig. 2. Comparison of the UV chromatograms, acquired at $\lambda=263$ nm, obtained with Methods 1 (A) and 7 (B). The sample was spiked with 80 ng g^{-1} . Peaks: 1=Glu-P-2; 2=IQ; 3=MeIQ; 4=Glu-P-1; 5=MeIQx; 6=7,8-DiMeIQx; 7=4,8-DiMeIQx; 8=Norharman; 9=TriMeIQx (I.S.); 10=Harman; 11=Trp-P-2; 12=PhIP; 13=Trp-P-1; 14= A α C; 15=MeA α C. *=non-pure peak. Chromatographic conditions as in Section 2.

As a main difference, a major peak which elutes near Glu-P-2 is avoided when using monofunctional C₁₈.

Another outstanding effect is that derived from the change in trademark. Although equivalent cartridges of different commercial origin provide similar recoveries (Methods 1 and 7), interesting differences were found in the UV chromatograms of the spiked meat extract (Fig. 2): while Bond Elut tridimensional C₁₈ (Method 1) gave an extract with a high peak in the tail of MeIQx, in the case of Isolute tridimensional C₁₈ (Method 7) this interference was smaller, but two new major peaks appeared at 6.3 and 11.0 min. In addition to the difficulty of integrating the analytes peaks in UV chromatograms, the presence of major peaks coeluting very near the compounds of interest has marked effects on the limit of detection obtained in the determination with MS, as discussed below.

3.3. Limits of detection in MS

As observed previously [39], the coelution of compounds coextracted from the matrix greatly influenced the limits of detection (LODs) when real samples were analysed using MS detection, probably due to ionisation interferences or problems of ion trap saturation, which produced a decrease in the signal-to-noise ratio. This effect was also confirmed in this work when LODs for the various tandem

extraction procedures were established. Detection limits based on a signal-to-noise ratio of 3:1 were calculated by spiking the beef extract at low concentrations levels (0.5–10 ng g⁻¹) with reference standards. Detection limits of the HAs already present in the sample were estimated from calibration curves taking into account the corresponding recovery values. Values obtained are shown in Table 4, where it can be seen that, in general, higher values were found for the HAs eluting in the first zone of the chromatogram, which is the least exhaustively purified. Moreover, in some cases significant differences were observed between methods. As an example, Fig. 3 shows that the trace at *m/z* 214, corresponding to MeIQx, obtained from the injection of the non-spiked extract purified using an Isolute tridimensional C₁₈ cartridge (Method 7), has less background noise than that obtained when the Bond Elut tridimensional C₁₈ cartridge was used (Method 1), producing a decrease in the LOD for MeIQx with Method 7. This can be explained by reference to the UV chromatograms in Fig. 2, where the peak in the tail of MeIQx is much higher using Method 1 than with Method 7. In addition, LODs for MeIQ obtained with Methods 3 and 4 were high due to the partial coelution of this analyte with an interference with the same *m/z* ratio. Since signals are not completely resolved, the integration was hindered at low levels of analyte concentration. From Table 4 it can also be deduced that high values can be related

Table 4
Limits of detection in the sample, obtained with MS detection

Analyte	Limits of detection (ng g ⁻¹)						
	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4	Method 5	Method 6	Method 7
Glu-P-2	5.4	4.0	3.7	3.9	4.1	5.0	4.8
IQ	4.1	4.2	3.9	4.2	4.2	3.9	4.3
MeIQ	7.7	7.8	9.6	10.2	7.2	6.5	6.7
Glu-P-1	9.1	5.9	4.7	6.4	4.7	4.8	7.7
MeIQx	5.2	4.6	5.1	4.0	4.0	4.4	2.9
7,8-DiMeIQx	4.5	3.5	3.1	3.1	3.7	3.7	3.7
4,8-DiMeIQx	3.2	4.3	3.8	3.3	3.6	4.4	3.8
Norharman	3.5	3.6	3.1	3.1	2.8	3.3	3.4
Harman	3.7	3.8	4.2	5.2	3.0	3.2	3.2
Trp-P-2	2.6	2.3	11.7	10.0	2.3	2.4	2.0
PhIP	1.9	2.2	2.4	1.7	2.1	1.97	2.2
Trp-P-1	4.3	2.4	N.D.	>15.0	2.8	4.0	2.7
AαC	0.5	1.1	0.4	1.0	0.8	0.7	1.2
MeAαC	0.8	0.8	0.7	1.3	0.7	0.7	0.7

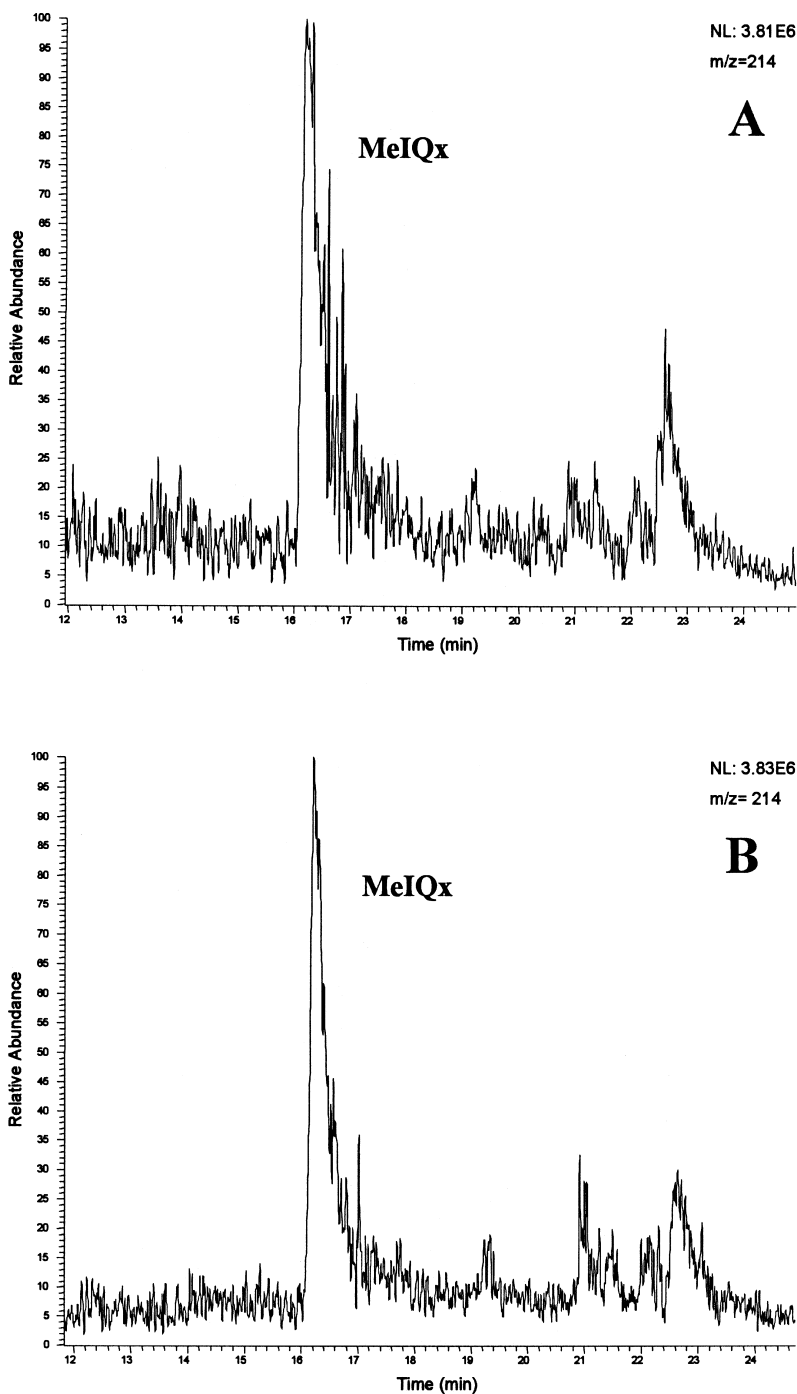


Fig. 3. Traces corresponding to m/z 214 (MeIQx) obtained with Methods 1 (A) and 7 (B).

Table 5
Quantification results in the analysis of the analytes present in the sample^a

Analyte	Method 1		Method 2		Method 3		Method 4		Method 5		Method 6		Method 7	
	ng g ⁻¹	SD	ng g ⁻¹	SD	ng g ⁻¹	SD	ng g ⁻¹	SD	ng g ⁻¹	SD	ng g ⁻¹	SD	ng g ⁻¹	SD
Glu-P-2	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	n.d.	–	N.D.	–	N.D.	–
IQ	32.5	7.3	37.4	2.7	31.2	4.2	37.4	7.5	37.5	3.2	35.1	2.8	34.4	4.9
MeIQ	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–
Glu-P-1	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–
MeIQx	41.4	2.6	45.9	3.9	46.1	2.1	39.9	1.3	40.2	1.4	39.6	2.7	40.1	1.5
7,8-DiMeIQx	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–
4,8-DiMeIQx	9.7	1.7	12.9	1.6	11.5	0.9	9.9	1.0	10.9	0.4	13.3	1.1	11.5	2.9
Norhaman	145.5	9.9	147.5	5.6	137.2	23.3	118.7	6.3	127.9	9.0	135.1	3.7	158.6	11.8
Harman	264.0	40.3	360.3	15.7	303.3	72.7	327.3	72.8	303.9	43.9	287.5	23.4	302.2	22.7
Trp-P-2	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–
PhIP	27.1	1.0	31.3	2.0	28.5	1.6	24.4	1.3	25.1	1.2	25.7	0.8	26.6	1.1
Trp-P-1	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–	N.D.	–
AαC	N.Q.	–	N.D.	–	N.Q.	–	N.Q.	–	N.D.	–	N.Q.	–	N.Q.	–
MeAαC	N.Q.	–	N.D.	–	N.Q.	–	N.Q.	–	N.D.	–	N.Q.	–	N.Q.	–

^a N.Q., below its limit of quantification; N.D., not detected.

to low recoveries, as in the case of Trp-P-1 and Trp-P-2 with Methods 3 and 4.

3.4. Analytical results

The analytes present in the sample were quantified with the LC–MS system described in Section 2, since unavoidable interferences produced when using UV detection prevented the quantification of some of the compounds, as was the case of IQ, MeIQ, Norharman or TriMeIQx. The results of the analysis are given in Table 5, which reveals that despite differences in the tandem extraction efficiency, similar values were obtained for the different methods tested. In addition to the four amines used to contaminate the original meat extract (IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx and PhIP), the two comutagenic amines harman and norharman were detected and quantified. The rest of analytes were not detected except the α -carbolines, which were below their LOQs.

4. Conclusions

In this study, the effect of changes of commercial

brand and structure of sorbents were studied on the basis of a previously developed clean-up procedure, but the conclusions can be generalised to the rest of procedures based on SPE proposed in the literature. For the PRS step, the most suitable cartridge was Isolute PRS 200 mg, due to the elimination of the acidic activation, which simplified the procedure, and because the recovery of all the analytes was higher than 50% without significant differences in the cleanness obtained, compared with the rest of cartridges. In the case of C₁₈ adsorbents, higher recoveries were obtained when monofunctional Isolute C₁₈ was used, but a better limit of detection was achieved for MeIQx, which is one of the most important analytes, with tridimensional endcapped Isolute C₁₈.

Differences between trademarks and structures suggest the necessity of a screening study previous to the analysis of a new sample, in order to select the most suitable sorbent for that case. Furthermore, successful application of a tandem extraction procedure greatly depends on the sample matrix composition. There is always a tandem extraction suitable for the analysis of HAs in meat extracts, but another purification procedure may be required for other samples.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge International Sorbent Technology, Ltd. for kindly providing sample extraction cartridges. This work was financed by the C.I.C.Y.T. research project ALI96-0863.

References

- [1] W. Barnes, N.E. Spingarn, C. Garvie-Gould, L.L. Vuolo, Y.Y. Wang, J.H. Weisburger, The Maillard reaction in foods and nutrition, in: ACS Series, Vol. 215, American Chemical Society, Washington, DC, 1983, p. 485.
- [2] M. Nagao, M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Sugimura, *Cancer Lett.* 2 (1977) 221.
- [3] G.A. Gross, R.J. Turesky, L.B. Fay, W.G. Stillwell, P.L. Skipper, S.R. Tannenbaum, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2313.
- [4] K.I. Skog, M.A.E. Johansson, M.I. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 879.
- [5] L.S. Jackson, W.A. Hargraves, W.H. Stroup, G.W. Diachenko, *Mutation Res.* 320 (1994) 113.
- [6] Ch. Bross, S. Springer, G. Sontag, *Deut. Lebensm.-Rundsch.* 93 (1997) 384.
- [7] E. Richling, C. Decker, D. Häring, M. Herderich, P. Schreier, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 71.
- [8] H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 121.
- [9] E.G. Snyderwine, H.A.J. Schut, R.H. Adamson, U.P. Thorgeirsson, S.S. Thorgeirsson, *Cancer Res. Suppl.* 52 (1992) 2099.
- [10] C.D. Davis, E.J. Dacquel, H.A.J. Schut, S.S. Thorgeirsson, E.G. Snyderwine, *Mutation Res.* 356 (1996) 287.
- [11] H. Ohgaki, S. Takayama, T. Sugimura, *Mutation Res.* 259 (1991) 399.
- [12] N. Ito, R. Hasegawa, K. Imaida, S. Tamano, A. Hagiwara, M. Hirose, T. Shirai, *Mutation Res.* 376 (1997) 107.
- [13] W. Zheng, D.R. Gustafson, R. Sinha, J.R. Cerhan, D. Moore, C.-P. Hong, K.E. Anderson, L.H. Kushi, T.A. Sellers, A.R. Folsom, *J. Natl. Cancer I* 90 (1998) 1724.
- [14] M.L. Slattery, K.M. Boucher, B.J. Caan, J.D. Potter, K.-N. Ma, *Am. J. Epidemiol.* 148 (1998) 4.
- [15] S. Murray, A.M. Lynch, M.G. Knize, N.J. Gooderham, *J. Chromatogr. A* 616 (1993) 211.
- [16] M. Murkovic, D. Steinberg, W. Pfannhauser, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 477.
- [17] G.A. Gross, *Carcinogenesis* 11 (1990) 1597.
- [18] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 719 (1996) 203.
- [19] M. Vanderlaan, M. Hwang, T. Djanegara, *Environ. Health Perspect.* 99 (1993) 285.
- [20] K. Skog, A. Solyakov, P. Arvidsson, M. Jägerstad, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 227.
- [21] S. Murray, N.J. Gooderham, A.R. Boobis, D.S. Davies, *Carcinogenesis* 10 (1989) 763.
- [22] H. Kataoka, K. Kijima, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 187.
- [23] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 207.
- [24] L.B. Fay, S. Ali, G.A. Gross, *Mutation Res.* 376 (1997) 29.
- [25] E. Richling, M. Herderich, P. Schreier, *Chromatographia* 42 (1996) 7.
- [26] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 655 (1993) 101.
- [27] M.M.C. Van Dyck, B. Rollman, C. De Meester, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 377.
- [28] B.H. Chen, D.J. Yang, *Chromatographia* 48 (1998) 258.
- [29] 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.
- [30] G.A. Gross, A. Grüter, S. Heyland, *Food Chem. Toxicol.* 30 (1992) 491.
- [31] M.G. Knize, R. Sinha, E.D. Brown, C.P. Salmon, O.A. Levander, J.S. Felton, N. Rothman, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4648.
- [32] Y. Zhao, M. Schelfaut, P. Sandra, F. Banks, *Electrophoresis* 19 (1998) 2213.
- [33] J. Wu, M.K. Wong, H.K. Lee, C.N. Ong, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 712.
- [34] S.D. Mendonsa, R.J. Hurtubise, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 22 (1999) 1027.
- [35] J.C. Olsson, A. Dyremark, B. Karlberg, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 329.
- [36] G.A. Perfetti, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 813.
- [37] A. Solyakov, K. Skog, M. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1.
- [38] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223.
- [39] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 307.
- [40] C. de Meester, M.T. Galceran, M. Rabache, Report EUR 17652 EN, BCR Information, 1997.
- [41] F. Toribio, Master Thesis, Barcelona, 1998.
- [42] S.D. Mendonsa, R.J. Hurtubise, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 239.