

# **Análisis de hidrocarburos policíclicos aromáticos y nitrosaminas en sistemas modelo de gelatina mediante SPME-DED**

**J. Ruiz Carrascal, S. Ventanas Canillas, D. Martín García y T. Pérez Palacios**

Tecnología de Alimentos; Facultad de Veterinaria UEx; Avnda. de la Universidad s/n; 10071 Cáceres

[jruiz@unex.es](mailto:jruiz@unex.es), [sanvenca@unex.es](mailto:sanvenca@unex.es), [dimaga@unex.es](mailto:dimaga@unex.es)

## **Resumen**

Se llevó a cabo la determinación de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos y 9 nitrosaminas en sistemas modelo de gelatina (20% w/v) mediante microextracción en fase sólida acoplada a un dispositivo de extracción directa y posterior análisis mediante cromatografía-gaseosa-espectrometría de masas. La extracción se llevo a cabo a 25°C. Se extrajeron la totalidad de las nitrosaminas y 9 de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se evaluaron la reproducibilidad, linealidad de respuesta y límite de detección de 3 tipos de fibras estacionarias para cada tipo de compuesto. Se seleccionaron las fibras de polidimetilsiloxano 100µm y carboxen/polidimetilsiloxano 85µm, para los hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitrosaminas, respectivamente. La microextracción en fase sólida acoplada a un dispositivo de extracción directa surge como una técnica interesante para la monitorización preliminar de la presencia de estos compuestos tóxicos en alimentos sólidos, sin necesidad de toma de muestras y sin deteriorar el producto.

**Palabras clave:** SPME-DED, hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas, alimentos.

## **Abstract: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrosamines in gelatin model systems using SPME-DED**

Analysis of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile 9 nitrosamines was carried out in gelatine model systems (20%w/w) using solid phase microextraction coupled to a direct extraction device and subsequently analysis by gas chromatographic-mass spectrometry. Extraction was performed at 25°C during 60min. All of nitrosamines and 9 of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons were extracted. Reproducibility, linearity and limit of detection of 3 fibres coatings for each type of compounds were evaluated. Polidimethylsiloxane 100µm and Carboxen/Polidimethylsiloxane 85µm were selected for polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrosamines, respectively. Solid phase microextraction coupled to a direct extraction device appears to be an interesting technique for preliminary screening of the presence of these toxic compounds in solid foodstuffs, without sampling step and deterioration.

**Key words:** SPME-DED, hydrocarbons aromatic polycyclic, nitrosamines, food

## Introducción

Las técnicas que se utilizan comúnmente en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y nitrosaminas (NAs) son laboriosas y requieren un gran consumo de tiempo y solventes. Además, precisan una toma de muestra necesaria que supone, en el caso concreto de su determinación en alimentos sólidos, el deterioro indeseable del producto y su consecuente depreciación. La microextracción en fase sólida (SPME) constituye una técnica alternativa en el estudio de estos compuesto al ser rápida, sencilla, se desarrolla en una única etapa y no requiere la utilización de solventes [1]. Sin embargo, la SPME requiere igualmente de una etapa de toma de muestras.

Ruiz y col. [2] han descrito la utilización de un dispositivo de extracción directa (DED) que consiste en un cilindro hueco y perforado y que permite la introducción de la fase de SPME en el interior del mismo, de forma que el conjunto SPME-DED se puede introducir directamente en la matriz sólida, facilitando así la extracción de compuestos volátiles de alimentos sólidos sin el deterioro del producto.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la eficacia de la técnica SPME-DED en la determinación de HAPs y NAs a partir de sistemas modelo de matrices sólidas y la selección de la fase de SPME más adecuada para estos compuestos.

## Material y métodos

*Reactivos y material.* El patrón de 16 HAPs (EPA 610 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons mix, Sigma Aldrich HAPs, 2000 $\mu\text{g/ml}$ ) estaba formado por: acenafteno, acenaftileno, antraceno, benz[*a*]antraceno, benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*ghi*]perileno, 2-bromonaftaleno, criseno, dibenz[*ah*]antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno[*1,2,3-cd*]pireno, naftaleno, fenantreno y pireno. El patrón de 9 NAs (EPA 8270 Nitrosamines mix, Sigma Aldrich NAs, 2000 $\mu\text{g/ml}$  en metanol) estaba compuesto por: N-nitrosodi-*n*-butilamina, N-nitrosodi-*n*-propilamina, N-nitrosodietilamina, N-nitrosodimetilamina, N-nitrosodifenilamina, N-nitrosometiletilamina, N-nitrosomorfolina, N-nitrosopiperidina y N-nitrosopirrolidina.

La preparación de disoluciones a partir de los patrones se realizó en metanol calidad HPLC (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain). Los sistemas modelo se elaboraron con gelatina de 300 Bloom tipo A (Sigma Aldrich, St Louis, USA).

*Preparación de los sistemas modelo de gelatina.* La gelatina se disolvió en agua destilada a 100°C (20%w/w). Se tomaron 30ml de esta disolución y se depositaron en tubos roscados de polipropileno. A continuación, se añadió la cantidad necesaria de HAPs o de NAs a partir de los patrones (patrón de HAPs diluido en metanol hasta 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y de NAs hasta 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para conseguir la concentración final deseada en la matriz de gelatina. Para los HAPs las concentraciones estudiadas fueron de 0,1 -10  $\text{ng mL}^{-1}$  y 1-50  $\text{ng mL}^{-1}$  para las NAs. Inmediatamente se cerraron los tubos, se agitaron (30s) y se almacenaron a 2-4°C hasta su análisis. Los sistemas modelo de gelatina fueron preparados por duplicado para cada una de las concentraciones estudiadas, excepto para la concentración de 10  $\text{ng mL}^{-1}$ , que se prepararon por quintuplicado para el calculo de la reproducibilidad.

*Extracción mediante SPME-DED.* Las fases estacionarias estudiadas para los HAPs fueron: Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 $\mu\text{m}$ , Poliacrilato (PA) 85 $\mu\text{m}$  y Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) 65 $\mu\text{m}$ , y para las NAs: PDMS/DVB 65 $\mu\text{m}$ , Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) 85 $\mu\text{m}$  y Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30  $\mu\text{m}$ . La extracción se llevó a 25°C en un baño termostatzado, durante 60min. Finalizado el tiempo de extracción, se recogió la fase estacionaria y se retiró del DED y se procedió a su desorción

cromatográfica. La temperatura del inyector fue de 280°C (CAR/PDMS), 270°C (DVB/CAR/PDMS), 260°C (DVB/PDMS), 300°C (PA) o 250°C (PDMS).

*Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.* Se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) (Agilent 6890 series; Agilent, Avondale, USA) acoplado a un espectrómetro de masas (EM) (Agilent 5973 Agilent, Avondale, USA). La columna capilar utilizada fue HP-5 (Hewlett-Packard, Avondale, USA) de 5% fenil metil silicona (50 m x 0.32 mm d.i., espesor de film 1.05  $\mu\text{m}$ ). Se aplicó un flujo constante de helio (1.1 ml/min), una presión de cabeza de columna de 25.1 Kp y una velocidad de 29 cm/s. En el caso de HAPs el programa de temperaturas fue de 130°C (0.5min), incremento hasta 290°C a razón de 5°C/min y mantenimiento a esta temperatura durante 42min. Para las NAs la temperatura de inicio fue de 50°C, ascenso hasta 80°C a razón de 5°C/min, mantenimiento a esta temperatura durante 27 minutos, ascenso a 25°C/min hasta alcanzar 250°C y mantenimiento a esta temperatura durante 6min.

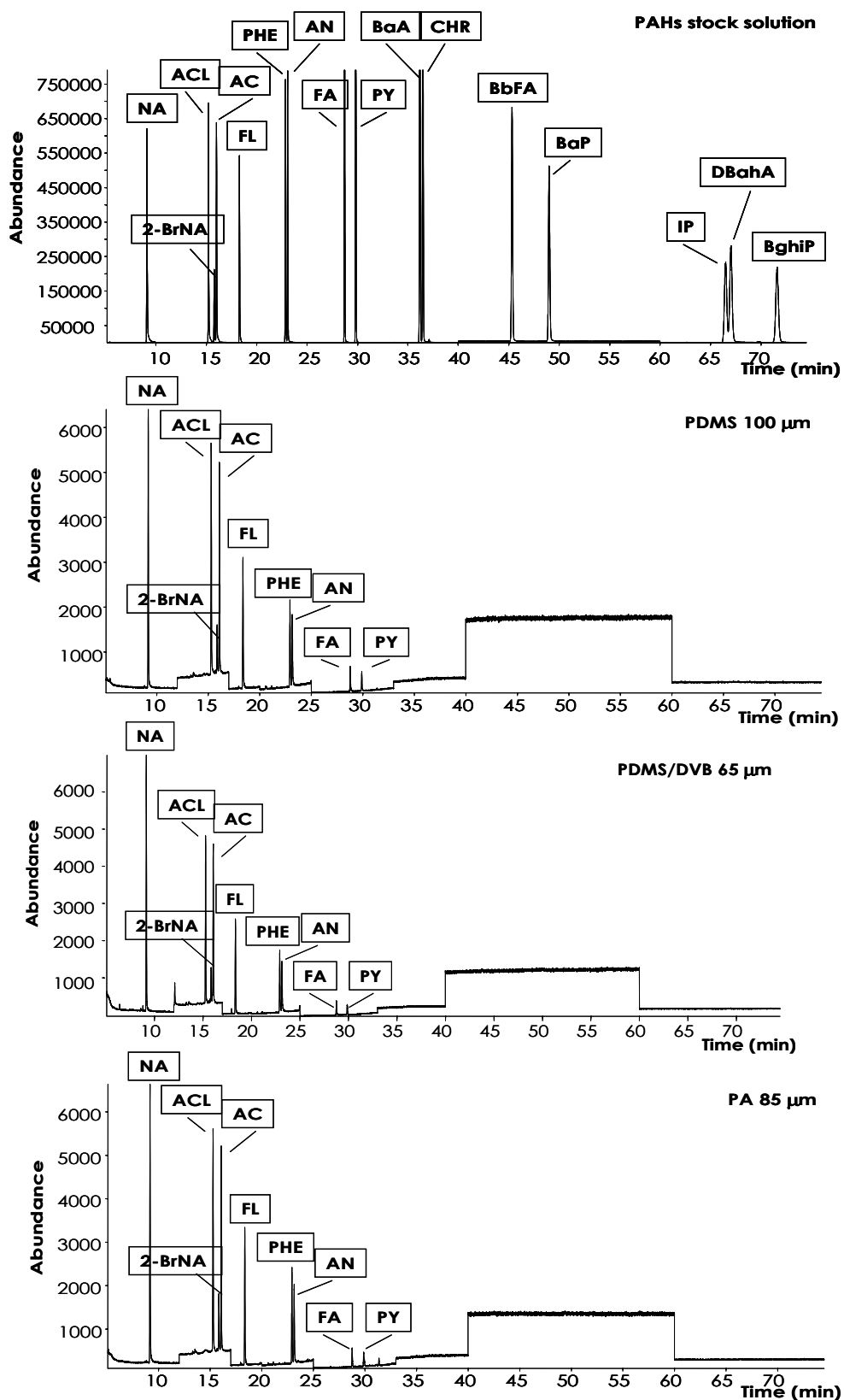
La línea de transferencia del EM se mantuvo a 280°C. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico a 70 eV, con un multiplicador electrón voltio de 1756V y recogiendo datos a una frecuencia de 1 scan/s en un rango de masas de 30 a 300 m/z. La detección de los diferentes HAPs y NAs se llevó a cabo operando en modo monitorización del ión seleccionado (SIM).

## Resultados

En las Figura 1 y 2 se muestran los cromatogramas obtenidos en la extracción de HAPs y NAs de sistemas modelo de gelatinas a 10 ng mL<sup>-1</sup> mediante SPME-DED con las 3 fases estacionarias evaluadas. Asimismo, se muestran los cromatogramas correspondiente a la disolución stock de los HAPs y NAs. Las 3 fases estacionarias estudiadas consiguieron extraer 9 de los 16 HAPs presentes en los sistemas modelo de gelatina. En el caso de las NAs, tanto la fase de CAR/PDMS como la de DVB/CAR/PDMS consiguieron la extracción de la totalidad de las NAs. Con la fase de PDMS/DVB solo pudieron detectarse 5 de las 9 NAs en estudio.

En la Tabla 1, se muestran los valores de desviación relativa estándar (%DRE) de cada una de las 3 fases estacionarias utilizadas en la extracción de HAPs y NAs (10 ng mL<sup>-1</sup>) mediante SPME-DED sobre sistemas modelo de gelatina. Del total de HAPs extraídos mediante la fase de PDMS, 6 de ellos presentaron una DRE por debajo del 10% (ACL, AC, FL, PHE, AN y PY). Con la fase de PDMS/DVB, sólo 2 de los 9 HAPs se encontraron por debajo del 10% (ACL y FL). Con la fase de PA la totalidad de HAPs extraídos presentaron una DRE por debajo del 10%. En el caso de las NAs, CAR/PDMS presentó un rango de DRE de 17.23-66.52%, con DVB/CAR/PDMS y PDMS/DVB los rangos fueron de 15.87-91.03% y 14.30-39.27 %, respectivamente.

La linealidad de la respuesta en área cromatográfica de cada fase estacionaria evaluada, fue estudiada a partir de los sistemas modelo de gelatina de concentración creciente de HAPs (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 ng mL<sup>-1</sup>) y NAs (1, 5, 10, 25 y 50 ng mL<sup>-1</sup>). Los valores de los coeficientes de regresión (R<sup>2</sup>) obtenidos se muestran en la Tabla 1. En general, los HAPs y NAs presentaron una respuesta de tipo lineal para cualquiera de las tres fases estacionarias. Los valores de R<sup>2</sup> fueron superiores a 0,9 para los HAPs en todos los casos (excepto para PY con PA 85 $\mu\text{m}$ ) y para la mayoría de las NAs.



**Figura 1.** Cromatogramas correspondientes a HAPs procedentes del patrón y extraídos mediante SPME-DED a partir de sistemas modelos de gelatina (10 ng mL<sup>-1</sup>) con 3 fases estacionarias distintas.

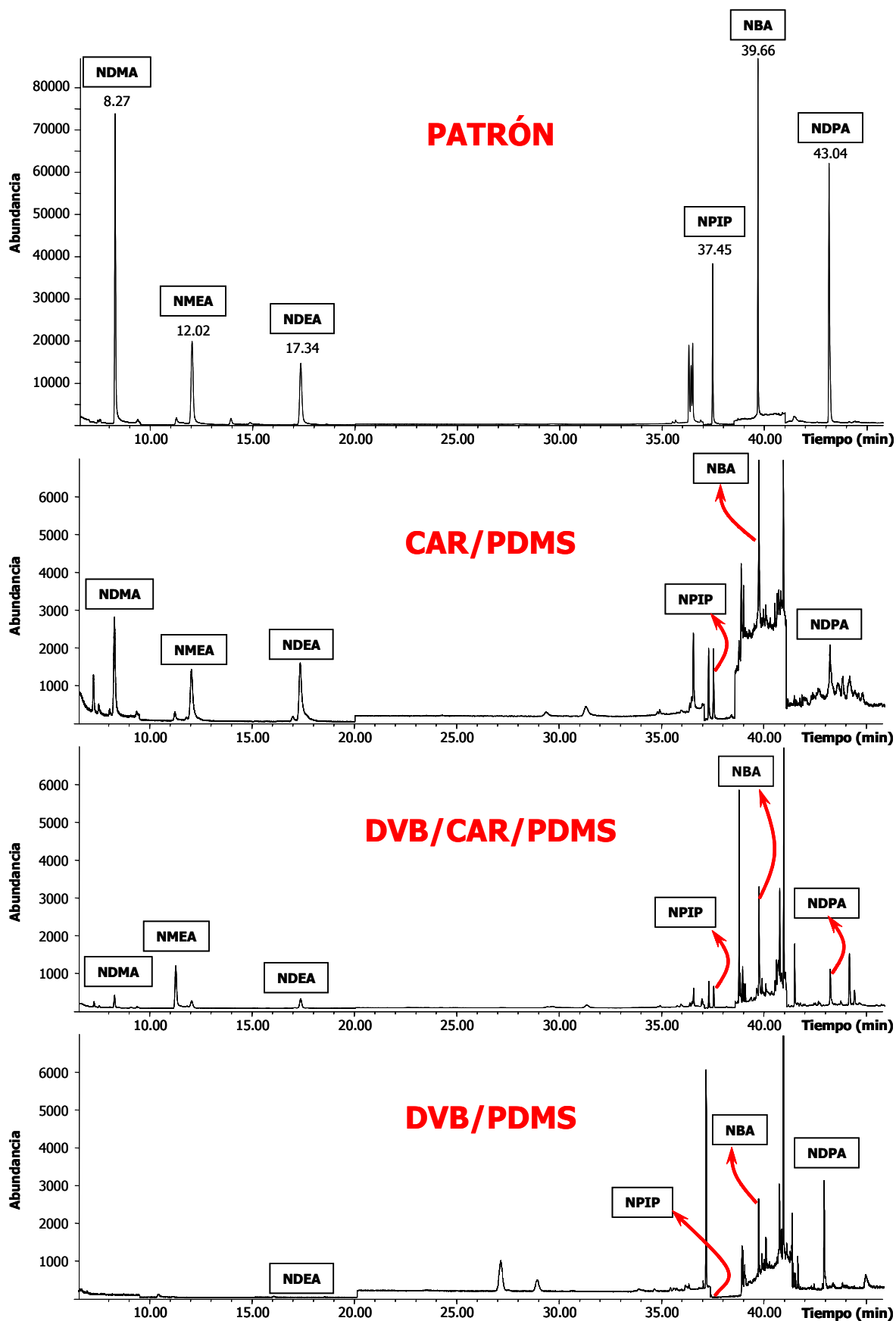
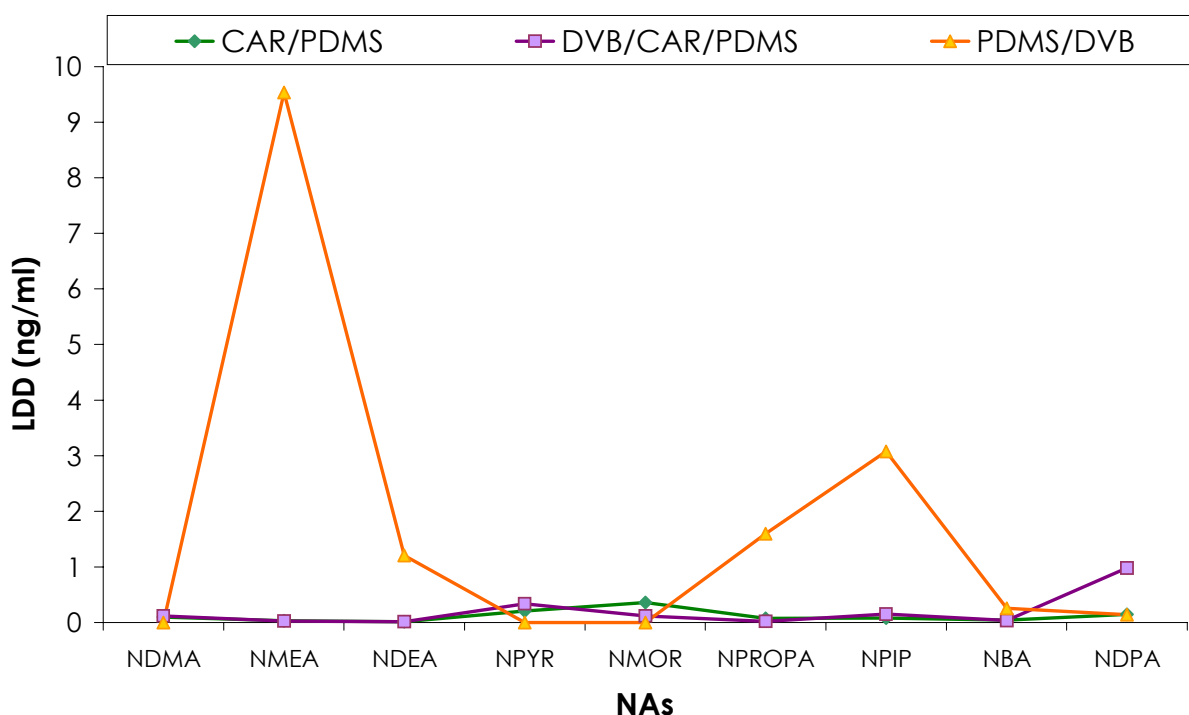


Figura 2. Cromatogramas correspondientes a NAs procedentes del patrón y extraídos mediante SPME-DED a partir de sistemas modelos de gelatina (10 ng mL<sup>-1</sup>) con 3 fases estacionarias distintas

**Tabla 1.** Valores de DRE (%) y coeficientes de regresión ( $R^2$ ) de cada una de las fase estacionarias utilizadas en la extracción de HAPs y NAs mediante SPME-DED a partir de sistemas modelo de gelatina.

HAPs	PDMS		PDMS/DVB		PA	
	DRE (%)	$R^2$	DRE (%)	$R^2$	DRE (%)	$R^2$
Naftaleno (NA)	17.72	0.9681	17.45	0.9081	9.20	0.9381
Acenaftileno (ACL)	6.93	0.9890	8.89	0.9416	7.49	0.9705
2-Bromonaftaleno (2-BrNA)	13.58	0.9814	12.80	0.9874	7.32	0.9594
Acenafteno (AC)	9.27	0.9909	10.62	0.9262	8.12	0.9620
Fluoreno (FL)	7.74	0.9911	8.16	0.9556	9.30	0.9667
Fenantreno (PHE)	5.24	0.9886	12.63	0.9439	8.01	0.9686
Antraceno (AN)	8.60	0.9983	13.62	0.9433	7.97	0.9726
Fluoranteno (FA)	13.05	0.9929	17.30	0.9555	5.68	0.9540
Pireno (PY)	9.18	0.9672	18.25	0.9314	9.33	0.8959
NAs	CAR/PDMS		PDMS/DVB		DVB/CAR/PDMS	
	DRE (%)	$R^2$	DRE (%)	$R^2$	DRE (%)	$R^2$
N-nitrosodimetilamina (NDMA)	22.95	0.9896	n.d.	n.d.	19.71	0.9986
N-nitrosometiletilamina (NMEA)	27.18	0.9959	n.d.	0.9644	17.16	0.9981
N-nitrosodietilamina (NDEA)	24.51	0.9968	16.75	0.9767	20.40	0.9972
N-nitrosopirrolidina (NPYR)	66.52	0.8751	n.d.	n.d.	43.23	0.8998
N-nitrosomorfolina (NMOR)	59.60	0.8743	n.d.	n.d.	21.42	0.7992
N-nitrosodi-n-propilamina (NDPA)	21.11	0.9953	14.30	0.9922	15.87	0.9943
N-nitrosopiperidina (NPIP)	39.31	0.9519	39.27	0.9646	24.49	0.9848
N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA)	17.23	0.8803	27.99	0.9816	91.03	0.9936
N-nitrosodifenilamina (NDPheA)	27.59	0.7998	38.03	0.9679	30.22	0.9659

En la Figura 3 se muestran los límites de detección (LDD) expresados en  $\text{ng mL}^{-1}$ , para cada HAP y NAs extraídos mediante SPME-DED a partir de sistemas modelo de gelatina, con cada una de las fases estacionarias estudiadas. Las 3 fases estacionarias evaluadas mostraron unos valores de LDD muy similares en el caso de HAPs, con un rango de  $0.008\text{-}0.102\text{ng mL}^{-1}$  para PDMS,  $0.016\text{-}0.075\text{ng mL}^{-1}$  para PDMS/DVB y  $0.012\text{-}0.138\text{ng mL}^{-1}$  para PA 85. Los valores de los LDD de las NAs fueron de  $0.011\text{-}0.357\text{ng mL}^{-1}$  para CAR/PDMS,  $0.015\text{-}0.983\text{ng mL}^{-1}$  para DVB/CAR/PDMS y  $0.142\text{-}9.539\text{ng mL}^{-1}$  para PDMS/DVB.



**Figura 3.** LDD ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) obtenidos en la extracción de HAPs y NAs mediante SPME-DED con distintas fases estacionarias a partir de sistemas modelo de gelatina.

## Discusión

La eficacia de la extracción mediante SPME en espacio de cabeza, depende tanto de las propiedades químicas de los compuestos como de las características de la fase estacionaria, destacando fundamentalmente 2 parámetros: la volatilidad del analito y la relación entre su polaridad y la de la fase estacionaria [1].

Los HAPs son compuestos de baja polaridad por lo que suelen emplearse fases de PDMS, de naturaleza líquida y apolar. Por el contrario, las fases de PA están más indicadas en la extracción de compuestos polares o débilmente polares y son de naturaleza sólida. El DVB confiere a la fase mixta de PDMS/DVB la propiedad de aumentar la capacidad de retención de analitos más polares y volátiles [1], de ahí que esta presentara una menor eficacia en la extracción de los HAPs, al ser compuestos de baja volatilidad. Las fases de CAR/PDMS se diseñaron también para incrementar la eficacia en la extracción de compuestos más polares, como es el caso de las NAs. Están compuestas por un material de carbono poroso adsorbente que le permite la captura de moléculas en un rango bastante amplio de pesos moleculares. La inclusión de DVB en la fibras de CAR/PDMS permite la extracción de compuestos polares pero de menor volatilidad [3]. A medida que se incrementa la volatilidad de los compuestos, y

desciende su peso molecular, se requieren fases estacionarias de mayor grosor [4]. Para las NAs de menor peso molecular, la fase de CAR/PDMS resultó más eficaz que la de DVB/CAR/PDMS, al presentar la primera mayor proporción de carboxen (85  $\mu\text{m}$  vs 30  $\mu\text{m}$ ). La fase de PDMS/DVB logró una extracción satisfactoria de las NAs de mayor peso molecular y menor volatilidad. Sin embargo, las NAs más volátiles (NDMA, NMEA y NPYR) no pudieron ser determinadas con esta fase. Por tanto, las fases que presentan carboxen fueron las más eficaces en la extracción del conjunto de NAs estudiadas.

En la extracción de HAPs, a pesar de que las 3 fibras mostraron una precisión muy similar ( $\text{DRE} < 20\%$  en todos los casos), la fase de PDMS/DVB fue la que mostró una peor reproducibilidad para la mayor parte de HAPs (Tabla 1). En el caso de las NAs estos valores son, en general, elevados, en comparación con los obtenidos mediante otros métodos de detección de NAs [5, 6]. No obstante, dadas las características del sistema (complejidad de la matriz, difícil equilibrio entre fases, condiciones de no equilibrio) la precisión fue aceptable. Las fases que contenían carboxen fueron las que presentaron unos peores resultados de reproducibilidad, debido a las especiales características de este material [7].

En general, tanto las NAs como los los HAPs presentaron una respuesta de tipo lineal en la extracción por las 3 fases estacionarias estudiadas (Tabla 1), lo que demuestra una adecuada linealidad en la respuesta de la técnica de SPME-DED para la extracción de estos compuestos a partir de matrices sólidas, al menos en el rango de concentraciones considerado. La fase de PDMS fue la que generó la mejor linealidad para la totalidad de los HAPs detectados. En el caso de las NAs, los valores de linealidad fueron ligeramente inferiores a los encontrados con otros métodos para la determinación de NAs [8, 9], lo que podría atribuirse a la menor reproducibilidad descrita con anterioridad. De hecho, Brunton y col. [10] describen una peor linealidad para aquellas fases estacionarias con peor precisión. Esta circunstancia se cumple igualmente en nuestro caso, tanto para HAPs como NAs que mostraron peor reproducibilidad.

Los valores de LDD obtenidos de HAPs, fueron bastante bajos para la mayor parte de los HAPs (Figura 2). Este hecho es indicativo, por tanto, de una buena sensibilidad de la técnica de SPME-DED para la extracción de estos compuestos. Destacó la fase de PDMS por dar lugar a los LDD más bajos para 5 de los 9 HAPs. Independientemente del tipo de fibra, se observó una tendencia hacia la pérdida de sensibilidad con el incremento del peso molecular de los analitos ya que debido a la menor volatilidad de estos HAPs, resulta más complejo hallarlos en el espacio de cabeza a bajas concentraciones, incrementándose entonces su LDD. Los valores más altos de LDD de las NAs se obtuvieron con la fase de PDMS/DVB. Para todas las NAs detectadas con las fases de CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS, los LDD fueron muy similares y en todos los casos inferiores a  $1 \text{ ng mL}^{-1}$ . No obstante, con la fase de CAR/PDMS se obtuvieron valores de LDD ligeramente inferiores para NAs que son detectadas con frecuencia en alimentos como, la NDMA (pescado), la NPYR (bacon) y la NPIP (embutidos con pimienta o pimentón).

Los valores referentes al LDD permiten disponer de una información adicional acerca de las concentraciones de HAPs o NAs que se podrían detectar en alimentos mediante la técnica de SPME-DED. Los valores de HAPs [11] o NAs [12] detectados de forma habitual en algunos alimentos son, en muchos casos, superiores a los LDD determinados mediante SPME-DED y, por tanto, serían detectables por este método.

Por tanto, se puede concluir que la técnica SPME-DED permite la extracción satisfactoria de HAPs y NAs de matrices de gelatina que imitan alimentos sólidos a las concentraciones que suelen estar presentes en los mismos. En base a los resultados de eficacia, precisión, linealidad y LDD, la fase de PDMS resultó ser la más adecuada para la extracción de HAPs mediante SPME-DED, mientras que en el caso de NAs, esta fibra fue la de CAR/PDMS.



## **Bibliografia:**

1. Pawliszyn, J. (1997). *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice*. Wiley-VCH. New York.
2. Ruiz J, Ventanas J, Cava R (2001). New device for direct extraction of volatiles in solid samples using SPME *J Agric Food Chem* 49:5115-5121
3. Machiels D, Istasse L. (2003). Evaluation of two commercial solid-phase microextraction fibres for the analysis of target aroma compounds in cooked beef meat. *Talanta*,61, 529-537.
4. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. (2000). Review: Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J Chrom A*. 880:35-62.
5. Sen NP, Seaman SW, Page BD (1997). Rapid semi-quantitative estimation of N-nitrosodibutylamine and N-nitrosodibenzylamine in smoked hams by solid-phase microextraction followed by gas chromatography –thermal energy analysis. *J Chrom A*. 788:131-140.
6. Mullet WM, Levsen K, Borlak J, Wu J & Pawliszyn J (2002). Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled with HPLC for the determination of N-nitrosamines in cell cultures. *Anal Chem*. 74:1695-1701.
7. Popp P, Pasckhe A (1997). Solid-Phase microextraction of volatile organic compounds using carboxen-polidimethylsiloxane fibres. *Chromatographia*. 46:419-424.
8. Luque-Pérez E, Rios A, Valcárcel M (2001). Automated flow-injection spectrophotometric determination of nitrosamines in solid food samples. *Fresenius. J Anal Chem*. 371:891-895.
9. Cárdenes L, Ayala JH, González V and Alfonso AM (2002). Fast microwave-assisted dansylation of N-nitrosamines Analysis by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chrom A*. 946:133-140.
10. Brunton NP, Cronin DA, Monahan FJ and Durcan R (2000). A comparison of SPME fibres for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem*. 68:339-345.
11. Gomaa E, Gray J, Rabie S, Lopez-Bote C, Booren A (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Add Contam*. 5:503-521.
12. Scanlan RA (2003). Nitrosamines. In: Caballero Benjamin, Trugo Luiz C. & Finglas Paul (Eds), *Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*. (pp. 4142-4146). Elsevier Science Ltd, Oxford.