

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA MINIATURIZADA PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS
MEDIANTE HS-SPME-GC/MS**

Miller Arbey Gamboa Castillo

**Director
Jhon Jairo Ríos Acevedo**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Cali, Colombia
2024**

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA MINIATURIZADA PARA LA
DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS
MEDIANTE HS-SPME-GC/MS**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Químico del estudiante: Miller Arbey Gamboa Castillo**

**Director
Jhon Jairo Ríos Acevedo**

**Línea de Investigación:
Alimentos y fármacos
Grupo de Investigación:
Grupo de investigación en electroquímica y medio ambiente (GIEMA)**

**Universidad Santiago de Cali
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Química
Cali, Colombia
2024**

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Costo del análisis, modificación del proceso.	Industrias alimentarias y farmacéuticas
Responsabilidad social	Técnica basa en los principios de la Química Verde. Consumo mínimo de solventes.	Empresas, gobiernos, consumidores.
Científico	Investigación sobre la formación y el comportamiento de las nitrosaminas.	Comunidad científica
Indicadores de Gestión	Informes y análisis de datos, Planes de acción y mejora continua.	Formación de talento humano.
Tecnológico	Equipos de análisis, Software y herramientas de gestión de datos, Modelos de predicción y simulación.	Laboratorios de análisis, Empresas de la industria alimentaria y farmacéutica
Ambiental	Técnica poco contaminante, enmarcada dentro de la Química Verde.	organismos reguladores Ambientales
Social	Formación de talento humano.	Universidad Santiago de Cali

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA MINIATURIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MEDIANTE SPME–HS-GC-MS

Miller Arbey Gambo Castillo¹, Jhon Jairo Ríos Acevedo

Miller. Gamboa00@usc.edu.co¹

Grupo GIEMA, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad Santiago de Cali

RESUMEN

Varios estudios han demostrado que el consumo de productos cárnicos procesados está fuertemente relacionado con el cáncer vinculadas con las nitrosaminas formada por la adición de sales de nitratos o nitritos y ciertas aminos. En este trabajo se desarrolló un método para la determinación de nitrosaminas volátiles en salchichas comerciales utilizando muestreo de espacio de cabeza mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (HS-SPME-GC-MS). Se evaluaron dos fibras de sílice fundida, una recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS) y otra con carboxen/polidimetilbenceno (CAR/PDMS). Se empleó un diseño factorial fraccional para evaluar la influencia del tiempo de equilibrio, fuerza iónica, tiempo de extracción, temperatura para la extracción y adición de metanol N- nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA) y N-nitrosopiperidina (NPIP) en salchichas. El método fue validado y aplicado para la determinación de nitrosaminas en embutidos, para rangos lineales entre 0 -50 µg/L, los coeficientes de determinación para las curvas de calibración estuvieron entre 0,9906 y 0,9976; los límites de cuantificación entre 0,254 y 0,389 µg/L, la precisión y exactitud del método estuvieron en los rangos de 2,7-7,3% y 70,2-86,4% respectivamente. El método implementado mostró ser simple, rápido, con exactitud, sensibilidad y precisión adecuadas.

Palabras clave: Carcinógenos, Cromatografía de gases, Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza, nitrosaminas, salchichas

DEVELOPMENT OF A MINIATURIZED TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF NITROSAMINES IN MEAT PRODUCTS USING SPME-HS-GC-MS

Abstract

Several studies have shown that the consumption of processed meat products is strongly linked to cancer associated with nitrosamines formed by the addition of nitrate or nitrite salts and certain amines. In this work, a method was developed for the determination of volatile nitrosamines in commercial sausages using headspace sampling by solid-phase microextraction and gas chromatography coupled to a mass spectrometer (HS-SPME-GC-MS). Two fused silica fibers were evaluated, one coated with polydimethylsiloxane (PDMS) and the other with carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS). A fractional factorial design was employed to evaluate the influence of equilibrium time, ionic strength, extraction time, extraction temperature, and the addition of methanol on the extraction of N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), N-nitrosodi-n-butylamine (NDBA), and N-nitrosopiperidine (NPIP) in sausages. The method was validated and applied for the determination of nitrosamines in sausages, with linear ranges between 0-50 $\mu\text{g/L}$. The coefficients of determination for the calibration curves ranged from 0.9906 to 0.9976; the limits of quantification were between 0.254 and 0.389 $\mu\text{g/L}$. The precision and accuracy of the method were within the ranges of 2.7-7.3% and 70.2-86.4%, respectively. The implemented method proved to be simple, rapid, and exhibited adequate accuracy, sensitivity, and precision.

Keywords: Carcinogens, Gas chromatography, Headspace solid phase microextraction, nitrosamines, sausages.

1. INTRODUCCIÓN

Las nitrosaminas, también conocidas como N-nitrosaminas, son un conjunto de compuestos químicos potencialmente cancerígenos para los humanos, lo que significa que pueden causar cáncer. Estos compuestos se forman generalmente a partir de la reacción de una amina secundaria con nitratos en un ambiente altamente ácido, y su formación se ve favorecida en presencia de altas temperaturas. Bajo condiciones ácidas, los nitritos reaccionan formando ácido nitroso (HNO_2), que a su vez se protona y se fragmenta generando agua y el catión nitroso (NO^+). Posteriormente, este catión nitroso reacciona con una amina, dando lugar a la formación de una nitrosamina (Scanlan, 1975; Tricker & Preussmann, 1991).

La presencia de nitrosaminas en productos cárnicos ha suscitado una creciente preocupación debido a su potencial carcinogénico. Estas sustancias se forman principalmente durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos cárnicos (Mirvish, 1995). Las nitrosaminas más comunes en estos productos son la N-nitrosodimetilamina (NDMA), la N-nitrosodietilamina (NDEA) y la N-nitrosopirrolidina (NPYR), entre otras (Cassens, 1997), figura 1.

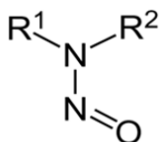


Figura 1. Estructura general de N-nitrosaminas

La determinación de nitrosaminas en diversas matrices ha sido un desafío significativo debido a su presencia en concentraciones muy bajas y la complejidad de las matrices alimentarias. Entre los métodos analíticos más utilizados para la extracción de nitrosaminas se encuentran la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos métodos son reconocidos por su alta sensibilidad y especificidad (Massawe et al., 2017; Sen et al., 1997).

La extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción sólido-líquido (SLE) son métodos analíticos tradicionales ampliamente utilizados para la determinación de nitrosaminas en diversas matrices. En la extracción líquido-líquido, las nitrosaminas se extraen de una fase acuosa a una fase orgánica, lo que permite su preconcentración y posterior análisis (Wang et al., 2011). Por otro lado, la extracción sólido-líquido implica la desorción de nitrosaminas desde una matriz sólida, como productos cárnicos, utilizando un solvente líquido adecuado. Este método es particularmente útil para matrices sólidas complejas y permite una mayor recuperación de las nitrosaminas. La SLE ha demostrado ser efectiva en la extracción de nitrosaminas de muestras alimentarias, proporcionando resultados consistentes y reproducibles. Sin embargo, la LLE y la SLE, requieren grandes volúmenes de solventes orgánicos, lo que puede ser costoso y tener un impacto ambiental negativo, además de incluir muchos pasos en su aplicación lo que induce incertidumbre a la metodología (Chen & Zhao, 2012). Otra técnica avanzada es la extracción en fase sólida (SPE), que también se ha utilizado ampliamente debido a su capacidad para manejar grandes volúmenes de muestra y su alta reproducibilidad (Paleologos et al., 2005).

En los últimos años, la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) ha emergido como una técnica prometedora para la extracción y preconcentración de nitrosaminas en matrices complejas como los productos cárnicos. Esta técnica, introducida por primera vez por Pawliszyn (1997), ofrece varias ventajas, incluyendo la reducción del uso de solventes, la disminución del tiempo de preparación de la muestra y la capacidad de integrarse fácilmente con sistemas analíticos como GC-MS (Zhao et al., 2006; Nabizadeh, 2023).

El proceso de SPME implica el uso de una fibra recubierta con una fase adsorbente que se expone a la muestra para adsorber los analitos de interés. Posteriormente, la fibra se introduce en un inyector de cromatografía de gases, donde los analitos son desorbidos térmicamente y analizados (Pawliszyn, 1997). Esta técnica ha demostrado ser efectiva en la detección de trazas de nitrosaminas en diversas matrices alimentarias, proporcionando resultados fiables y reproducibles (Zhao et al., 2006).

El presente estudio se centra en la aplicación de la microextracción en fase sólida para la determinación de nitrosaminas en productos cárnicos por GC-MS, evaluando su eficiencia y comparándola con los métodos analíticos convencionales. El objetivo es establecer un procedimiento optimizado que pueda ser utilizado en rutinas de control de calidad y seguridad alimentaria.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Reactivos:

Las nitrosaminas volátiles (NAs), N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA) y N-nitrosopiperidina (NPIP) fueron adquiridas de Sigma Aldrich. El metanol fue de calidad cromatográfica, el cloruro de sodio fue de calidad analítica, ambos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (MO, EE. UU.), el agua purificada utilizada fue Tipo I, obtenida de un sistema Milli-Q (Millipore).

2.2. preparación de la muestra

2.2.1. Solución estándar

Se prepararon soluciones madre estándar de NDMA, NDEA, NPIP y NPYP mediante dilución del volumen apropiado de los estándares con metanol hasta una concentración final de 1000 µg/L. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante dilución de la solución madre estándar con agua purificada en un sistema Milli-Q, para alcanzar concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/L.

2.2.2. Preparación de las muestras de salchichas

Para evaluar la técnica implementada, se adquirieron en supermercados de cadena tres muestras de salchichas comerciales de fabricantes diferentes. De cada marca, se tomaron 2 gramos de salchichas previamente maceradas en un mortero, seguidamente, se le añadieron 10 mL de agua Tipo I, se colocaron en viales de 25 mL sellados con septos de teflón y silicona.

2.3 . Instrumentación

2.3.1 . Cromatografo de Gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS)

Las Nitrosaminas objetivo se analizaron en un sistema cromatográfico GC-MS, Shimadzu Nexis GC-2030 equipado con una columna SH-Rxi-5Sil MS de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm y con las siguientes condiciones de funcionamiento: modo de inyección splitless y temperatura inicial del horno de 75°C (tiempo de espera 1 min), aumentando a una velocidad de 20°C/min a hasta 150°C (tiempo de espera 5

min) y aumentando a una velocidad de 10°C/min hasta 300°C (tiempo de espera 5 min). Se utilizó helio grado 5.0 como gas portador a un flujo de 1,0 mL/min. La temperatura tanto del puerto de inyección como de la interfaz se estuvieron a 250°C. El espectrómetro de masas de cuadrupolo simple, se operó en modo de ionización por impacto electrónico (EI) con energía de ionización de 70 eV, temperatura de la fuente de iones de 220°C, los analitos fueron monitoreados en el modo scan.

2.3.2. Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME)

Para la HS-SPME, se utilizó una fibra de 100 µm, de 10 mm de largo, con aguja de calibre 23 (RESTEK, EE. UU.). Los parámetros de SPME fueron los siguientes: temperatura de condición de la fibra 250 °C, tiempo de acondicionamiento de la fibra 60 minutos de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para el proceso de extracción de las nitrosaminas volátiles, la temperatura de extracción fue de 50 °C, durante un tiempo de extracción de 60 minutos, el tiempo de desorción en el puerto de inyección del GC fue de 5 minutos, a una temperatura de 250 °C y tiempo de limpieza del tiempo 10 min.

2.3.3. Optimización de las condiciones HS-SPME.

Se optimizó la eficacia del análisis cromatográfico para las nitrosaminas objetivo en productos cárnicos (salchichas), estudiando los parámetros del modo HS-SPME, incluida la fibra de microextracción (CAR/PDMS, PDMS) la temperatura de extracción (25, 40 y 50 °C), el tiempo de extracción (30, 60 y 90 min), adición de un solvente orgánico en este caso metanol (0, 2 y 5 mL) y modificación de la fuerza iónica con adición de cloruro sódico (NaCl) a concentraciones de 0, 10 y 20%. Se analizaron las muestras de 3 productos cárnicos (Salchichas) enriquecidas con 4 nitrosaminas en una concentración de 30 µg/L. Para conseguir el mejor desempeño de la técnica implementada, se realizó un diseño experimental paso a paso o simplex, en este diseño los factores o parámetros estudiados (elección de la fibra, temperatura de extracción, tiempo de extracción y solvente). Para cada factor se estudian 3 niveles diferentes, como mejor nivel por factor, se tomó el que tuvo un área de pico cromatográfico mayor; para este diseño experimental los valores óptimos se obtendrán en un total de 12 experimentos (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño experimental simplex utilizado en la optimización de la HS-SPME

ENSAYO	1		2			3			4			5		
	Fibra		Temperatura de extracción (°C)			Tiempo de Extracción(min)			Adición Solvente MeOH			Adición NaCl (%)		
	Car/PDMS	PDMS	25	40	50	30	60	90	0	2	5	0	10	20
1	+				+		+		+			+		
2		+			+		+		+			+		
3		+	+				+		+			+		
4		+		+			+		+			+		
5		+			+	+			+			+		
6		+			+			+	+			+		
7		+			+		+			+		+		
8		+			+		+				+	+		
9		+			+		+		+				+	
10		+			+		+		+					+

2.4. validación del método

La evaluación de la validación se realizó mediante la linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión, se hizo en referencia a las directrices sugeridas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (IUPAC, 2002). Las curvas de calibración se construyeron analizando las soluciones estándar de N-nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA) y N-nitrosopiperidina (NPIP), con un rango de concentración de 0 a 50 µg/L. La linealidad expresada como coeficiente de determinación (r^2) se obtuvo mediante regresión lineal de mínimos cuadrados cuyo valor

era aceptable superior a 0,995. La sensibilidad se evaluó determinando el límite de detección (LOD) en relaciones señal-ruido (S/N) de 3 y el límite de cuantificación (LOQ) en relaciones señal-ruido (S/N) de 10. La precisión (RSD en %) se evaluó a un nivel (30 µg/L) en el mismo día (n = 3) durante tres días consecutivos (n = 9). La exactitud, expresada como recuperación (%), se determinó analizando los analitos objetivo en un procedimiento intradiario, para el cual se comparó el contenido de un analito adicionado de las nitrosaminas objetivos en la matriz blanco (A) y en la solución estándar (B) mediante la siguiente fórmula : $[A]/[B] \times 100 \%$, donde los nivel adicionado fue de 30 µg/L.

3. RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1. Desarrollo del método GC-MS

En el análisis por GC la eficacia de la separación cromatográfica de las cuatro nitrosaminas estudiadas está determinada por la columna empleada. Generalmente, las columnas aplicables para analizar nitrosaminas se dividen en tres grupos según su polaridad: columnas no polares (por ejemplo, 5% de fenilmetilpolisiloxano, HP-5MS y DB-5MS), columnas de polaridad intermedia (por ejemplo, 35% de fenilmetilpolisiloxano). y HP-35MS) y columnas de alta polaridad (por ejemplo, polietilenglicol, DB-WAX y TG-WAX) (U.S. Food and Drug Administration, 2019; Sieira, B. J. et al., 2020). En este estudio, se utilizó una columna SH-Rxi-5Sil MS de fase estacionaria de polisiloxano, con una polaridad baja. La columna mostro una buena resolución para la separación de las cuatro nitrosaminas estudiadas. Las condiciones de MS se optimizaron para recopilar las transiciones iónicas óptimas para cada analito. La recolección de iones se implementó en modo de escaneo completo (50–500 m/z) con una energía de ionización de 70 eV para lo cual la condición fue suficiente para generar fragmentos adecuados para las nitrosaminas estudiadas em modo scan.

3.2. Optimización de las condiciones HS-SPME.

La SPME es un proceso basado en equilibrio químico, el cual depende de la partición de analitos entre las fases acuosa y la fase estacionaria de la fibra, por lo cual se deben favorecer las condiciones para que la extracción sea eficiente (Lord, H., & Pawliszyn, J., 2000). La elección del recubrimiento de la fibra y el modo de extracción depende de las propiedades del analito y de la matriz de la muestra. A pesar del carácter volátil de las nitrosaminas investigadas y la complejidad de la matriz de la muestra, se eligió el modo de extracción HS-SPME. El modo de muestreo HS es más apropiado para matrices alimentarias debido a que la fibra no estará en contacto directo con las muestras y, por tanto, podría tener una vida útil más larga. La optimización de las condiciones experimentales de HS-SPME se realizó en varios pasos utilizando una metodología univariada aplicando un diseño experimental Simplex. Se sabe que el recubrimiento de la fibra SPME domina la afinidad de los analitos objetivo, lo que afecta el análisis (Peña, J. et al., 2021); por esta razón, el primer factor estudiado fue la elección de la fibra; se estudiaron las fibras de PDMS de fase no polar y la fibra CAR/PDMS de fase poco polar, las respuestas en área de pico no fueron significativamente diferentes, por lo cual se seleccionó la fibra de compuesta de la fase PDMS (figura 1a). La eficiencia de extracción también fue verificada por la temperatura de extracción, se estudiaron tres temperaturas diferente (25, 40 y 50°C), con el objetivo de obtener la mejor eficiencia (figura 2b), la temperatura es importante ya que el proceso de extracción se realiza en espacio de cabeza y esta favorece la concentración de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza (J. M. Kokosa, 2013), mejorando de manera significativa la sensibilidad cromatográfica para las nitrosaminas objetivos para los 50°C.

Generalmente, la eficiencia de extracción aumenta con el tiempo de contacto de la fase extractiva con los analitos presentes en la muestra. La figura 2c, muestra que la fibra extractora tiene una afinidad promedio por la mayoría de las nitrosaminas estudiadas a un tiempo de 60 minutos, este parámetro implicó encontrar

el equilibrio ideal entre la cantidad de compuesto extraído y el tiempo invertido en el proceso. La adición de un solvente puede alterar las propiedades de la matriz de la muestra, afectando la volatilidad de los analitos. Un solvente adecuado puede mejorar la liberación de los analitos de la matriz hacia la fase de cabeza, incrementando su disponibilidad para la extracción por la fibra SPME (Bicchi, C., & Iori, C., 2003). El uso de solventes también puede ayudar a liberar analitos que están fuertemente retenidos en la matriz. Esto es particularmente útil en matrices complejas donde los analitos pueden estar adsorbidos o atrapados en componentes de la matriz. La adición de un solvente puede disolver o dispersar estos componentes, mejorando la recuperación de los analitos (Ouyang, G., & Pawliszyn, J., 2006). Se ha demostrado que el efecto de la salinización, es decir, el complemento de sales inorgánicas a la solución de extracción para SPME, aumenta el coeficiente de actividad, lo que mejora así la sensibilidad cromatográfica de los analitos objetivo (Robards, K. et al 2004) . En este estudio, la adición de metanol y de NaCl no mostraron una mejoría en la extracción de las cuatro nitrosaminas objetivo (figura 2d, 2e).

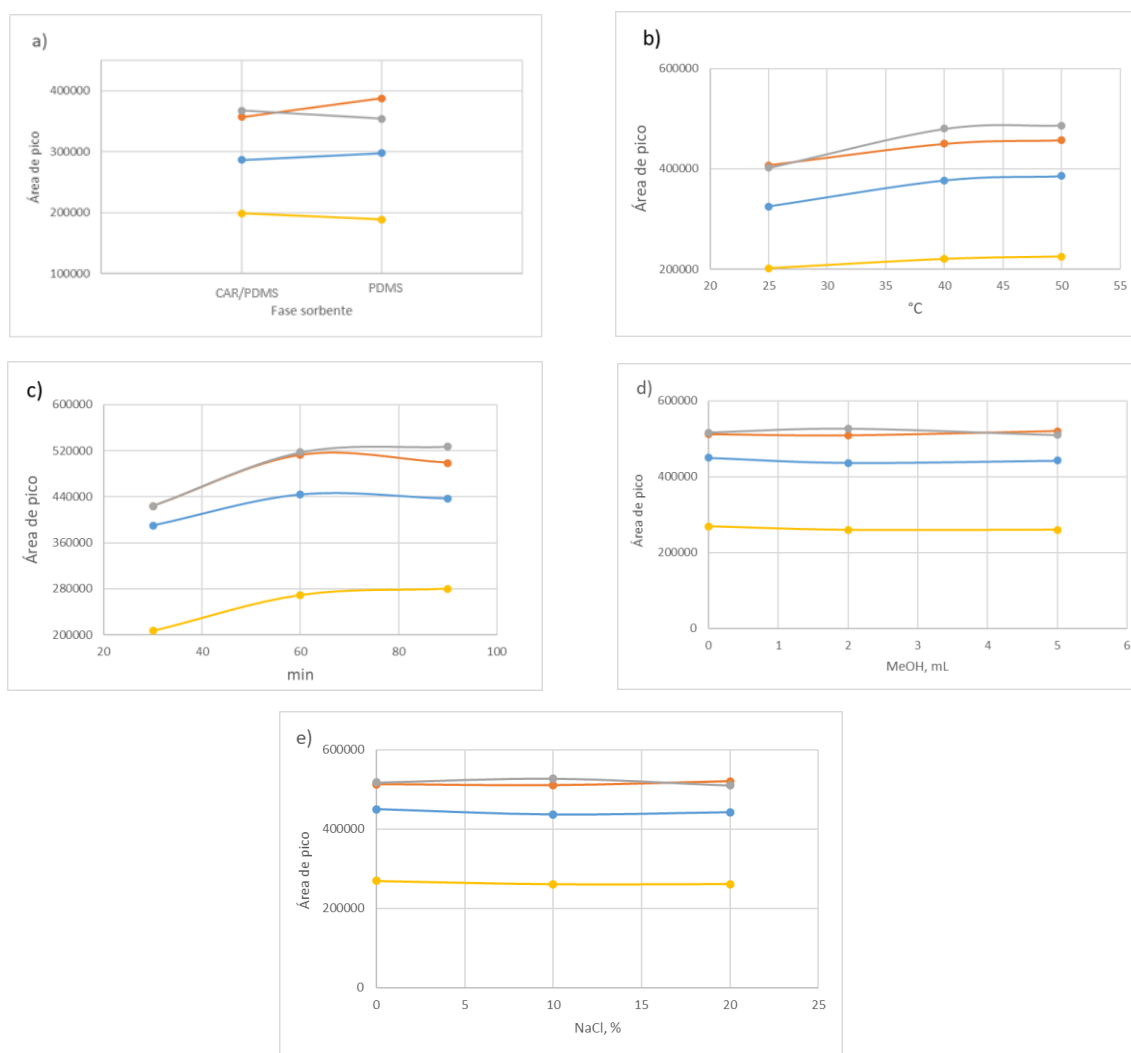


Figura 2. Optimización de la HS-SPME-GC-MS — NDMA — NPIP — NDBA — NDEA a) Fibra SPME, b) Temperatura de extracción, c) Tiempo de extracción, d) adición de MeOH, e) Fuerza iónica (%NaCl)

Concluyendo los resultados anteriores, las condiciones óptimas para HS-SPME para la cuantificación de las cuatro nitrosaminas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones óptimas para la separación de nitrosaminas por HS-SPME

Parámetro	Valor óptimo
Fibra SPME	PDMS
Tiempo de extracción	60 min.
Temperatura de extracción	50°C
Volumen Solvente (MeOH)	0 mL
Fuerza iónica (% NaCl)	0%

La figura 3 muestra el cromatograma de una solución estándar tras el análisis simultáneo de las 4 nitrosaminas mediante HS-SPME-GC-MS. Los picos cromatográficos mostraron una buena resolución y separación.

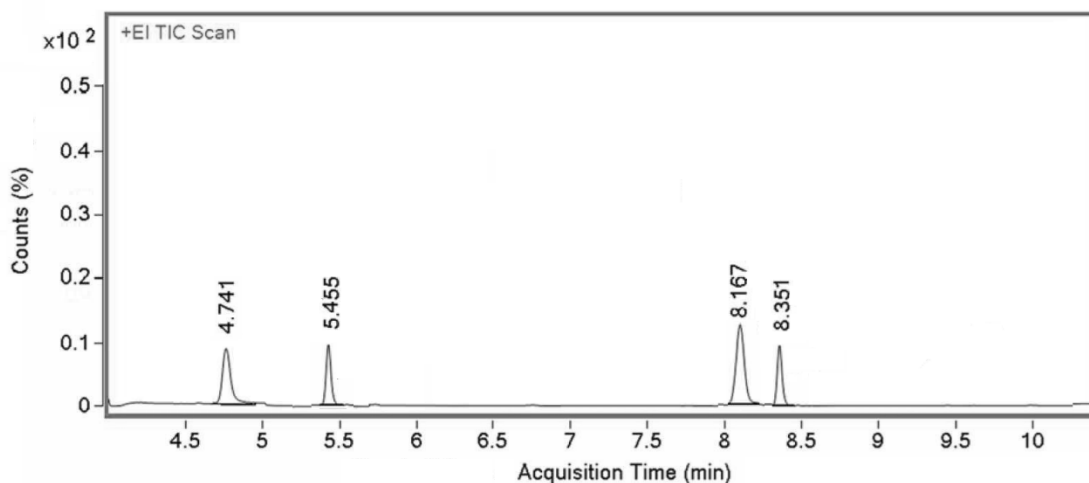


Figura 3. Cromatograma con las condiciones óptimas de HS-SPME-GC-MS para la separación de NDMA (tr 4,741min), NDEA (tr 5,455 min), NDBA (tr 8,167 min) y NPIP (tr 8,351 min) a una concentración de 30 µg/L.

3.3. Características analíticas del método

Con las condiciones experimentales establecidas para la extracción HS-SPME, se validó internamente el método para la determinación de nitrosaminas en salchichas utilizando los siguientes criterios de desempeño: linealidad y rango, precisión, límite de detección (LOD). límite de cuantificación (LOQ) y exactitud. Los resultados se presentan en la Tabla 3. La linealidad, rango y sensibilidad se obtuvieron a partir de una gráfica mediante el método de adición estándar con seis niveles de concentración, con análisis por triplicado.

Tabla 3. Características analíticas del método por HS-SPME-GC-MS

Parámetro de validación	NDMA	NPIP	NDBA	NDEA
Rango lineal (µg/L)	10-50	10-50	10-50	10-50
r ²	0,9906	0,9941	0,9936	0,9976
LOD (µg/L)	0,389	0,348	0,326	0,254
LOQ (µg/L)	1,848	1,562	1,473	2,840
Precisión %RSD	2,7 %	4,5 %	6,6 %	7,3 %
%Recuperación	82,2 %	86,4 %	79,1 %	70,2 %

El enfoque empleado para evaluar la precisión del método se basó en la recuperación de cantidades conocidas de cada nitrosamina agregada a muestras de salchichas al nivel medio del rango lineal, utilizando análisis por triplicado. El LOD y el LOQ se determinaron con una relación señal-ruido de 3 y 10, respectivamente, medida en el tiempo de retención aproximado del pico del analito correspondiente.

3.4. Análisis de muestras

Debido a que las muestras de embutidos son matrices alimentarias complejas que contienen agua, carbohidratos, material proteico y grasa, entre otros constituyentes, las muestras de diferentes productores son diferentes en composición, y la eficiencia de extracción de HS -SPME está fuertemente influenciada por las matrices, la determinación de las nitrosaminas volátiles en muestras de embutidos se realizó mediante el método de adición estándar. En dos de las tres muestras de salchichas comerciales adquiridas en supermercados se encontraron trazas de nitrosaminas. Cabe mencionar que se ha establecido un nivel de cumplimiento de 10 µg/L para la presencia de nitrosaminas en salchichas (USDA., 2004), las nitrosaminas encontradas se encontraban por debajo del límite de cuantificación (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados análisis de nitrosaminas en salchichas por HS-SPME-GC-MS

Muestra	µg/L			
	NDMA	NPIP	NDBA	NDEA
1	n.d	n.d	n.d	n.d
2	0,39*	0,95*	n.d	n.d
3	0,70*	1,42*	1,56*	n.d

- Detectada por debajo del límite de cuantificación.

CONCLUSIONES

La microextracción en fase sólida con muestreo de espacio de cabeza ha demostrado ser una técnica de extracción adecuada para la determinación de nitrosaminas volátiles mediante HS-SPME-CG-MS en cárnicos como salchichas. El método es simple, permite un análisis rápido, sin uso de solventes, poca manipulación de la muestra, está libre de interferencias de la matriz y presenta una sensibilidad adecuada. El presente método puede ser referencial al analizar múltiples impurezas de nitrosamina en cárnicos para atender las recomendaciones de la legislación alimentaria vigente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alshehri YM, Alghamdi TS, Aldawsari FS. (2020). HS-SPME-GC-MS as an alternative method for NDMA analysis in ranitidine products. *J Pharm Biomed Anal.* 2020 Nov 30;191:113582. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113582.

Ana bellido correa (2021). Desarrollo de un método analítico mediante HPLC –MS/MS para la determinación de N-nitrosaminas en fármacos. máster en técnicas cromatográficas aplicadas universitat rovir i virgili.

Bian Y., Zhang Y., Zhou Y., Li G.H, Feng X.S. (2021). Progress in the pretreatment and analysis of N-nitrosamines: an update since 2010. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 61 (2021), pp. 3626-3660, 10.1080/10408398.2020.1803790.

Bicchi, C., & Iori, C. (2003). Headspace solid-phase microextraction in the analysis of the aroma of fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 985(1-2), 231-238. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01636-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01636-0)

Calvarro J; Ruiz, J. (2011). Estudio de nitrosaminas en productos cárnicos. Cáceres: Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Tecnología de Alimentos;

Chen, D., & Zhao, Y. (2012). Optimization of solid-liquid extraction of nitrosamines from food matrices using response surface methodology. *Journal of Chromatography A*, 1247, 68-74.

Eizondo, A. (2021). Determinación de nitrito de sodio en un embutido por espectrofotometría visible mediante el reactivo de Griess.

Elena Alarcón carravilla (Julio 2020) Facultad de farmacología Universidad complutense- trabajo fin de grado: nitrosaminas en fármacos v losartan y ranitidina.

Food and drug administration (2021). <https://fda.gov> (consulta: 15/09/2023) gao, h.; yang, f.; zhu, b.; yin, s.; fu, y.; li, y.; liao, Y.; Kang, M.; Zhang, Y.; He, J.; et al. (2023) Optimization of HSSPMEGCMS for the Determination of Volatile Flavor Compounds in Ningxiang Pork Foods, 12, 297. <https://doi.org/10.3390/foods12020297>.

Gushgari A.J., Halden R.U. (2018). Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines *Chemosphere*, 210, pp. 1124-1136, 10.1016/j.chemosphere.2018.07.098.

Huang M., Chen C., Fu S., Ding W. (2013). Determination of volatile N-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – Chemical ionisation mass spectrometry, *Food Chemistry*, Volume 138, Issue 1, Pages 227-233, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.119>.

Li Y., Pang T., Shi J., Liu X., Xu Z., Song Z., Xie H. (2023). Determination of tobacco-specific nitrosamines in tobacco and mainstream cigarette smoke using one-step clean-up coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, Volume 1710, pp. 464436, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464436>.

Lord, H., & Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), 153-193. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00345-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00345-5)

Massawe, E., Deshpande, A., & Mutukumira, T. (2017). Analytical methods for determination of nitrosamines in food products: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 20-37.

Ministerio de salud y protección social - minsalud (2015). <https://www.minsalud.gov.co> (consulta: 15/09/2023). chemistry, volume416,pp.135759, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135759>.

Netpharmalab (2024) Inicio Análisis Físico-Químico Análisis de Nitrosaminas. Madrid España.

Ordóñez Pereda A., Anadón Navarro A.; Arboix Arzo, M. et al. (2008). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN, en relación con el riesgo de la posible presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, (8), págs. 9-40.

Organización mundial de la salud. (2019) actualización sobre las impurezas de nitrosaminas.

Ouyang, G., & Pawliszyn, J. (2006). Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(7), 692-703. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.05.009>

Peña, J., Laespada, M. E. F., Pinto, C. G., & Pavón, J. L. P. (2021). Multiple headspace sampling coupled to a programmed temperature vaporizer – gas chromatograph-mass spectrometer for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and saliva. *Microchemical Journal*, 161, Article 105822. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105822>

Robards, K., Haddad, P. R., & Jackson, P. E. (2004). Gas chromatography. En *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods* (pp. 75-177). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-057178-2.50006->

Robles, H. Nitrosamines. Reference Module in Biomedical Sciences 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00155-X>.

Sieira, B. J., Carpinteiro, I., Rodil, R., Quintana, J. B., & Cela, R. (2020). Determination of N-nitrosamines by gas chromatography coupled to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry in water samples. *Separations*, 7, 3. <https://doi.org/10.3390/separations7010003>

Thermo Fisher scientific (2022) Guía de soluciones para el análisis de impurezas de nitrosamina.

U.S. Food and Drug Administration. (2019). GC/MS headspace method for detection of NDMA in valsartan drug substance. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/115965/download> [Consultado el 29 de enero de 2024].

USDA. (2004). US Code of Federal Regulations. Food Safety and Inspection Service, USDA § 424.22. Certain other permitted uses. 9 CFR Ch. III (1-1-03 Edition).

Wang, W., Xie, Y., & Selbes, M. (2011). Evaluation of liquid-liquid extraction for nitrosamines analysis in water. *Analytical Chemistry*, 83(17), 6841-6846.

Zhao C., Zhang H., Zhou J. et al. (2022). Metabolomics-based molecular signatures reveal the toxic effect of co-exposure to nitrosamines in drinking water, *Environmental Research*, Volume 204, Part B, pp. 111997, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111997>.