

DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAR NUEVE AMINAS BIOGÉNICAS MEDIANTE DERIVATIZACIÓN CON CLORURO DE BENZOILO (LIGERO/DEUTERADO) POR HPLC-ESI-ITMS²

Johan Axel Alfaro Valadez ^{a*}, Katarzyna Wrobel ^a, Kazimierz Wrobel ^a, Alma
Rosa Corrales Escobosa ^a

^a Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, Guanajuato
36050, México. ja.alfarovaladez@ugto.mx

Resumen

Las aminos biogénicas (ABs) son compuestos nitrogenados que, en exceso, pueden causar efectos tóxicos tras el consumo de alimentos contaminados, especialmente fermentados. Dada su alta polaridad, baja volatilidad y la complejidad de las matrices alimentarias, su cuantificación requiere el uso de procedimientos selectivos y sensibles. El método desarrollado se basa en la derivatización de ABs con cloruro de benzoilo (ligero y pesado) y posterior análisis por HPLC-ESI-ITMS/MS. Se evaluaron nueve ABs (putrescina, cadaverina, histamina, agmatina, bencilamina, triptamina, tiramina, espermina y espermidina) utilizando hexametildiamina como estándar interno con el fin de eliminar posibles imprecisiones/errores cometidos antes de etapa de derivatización. La reacción de derivatización se llevó a cabo a temperatura ambiente, seguida de extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂. La separación cromatográfica se realizó en una columna C18, optimizando el programa de gradiente con la fase móvil A (AF 0.1 %) y fase móvil B (MeOH) para la adecuada separación de los analitos. La adquisición de datos espectrales se realizó en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Los resultados permitieron establecer las condiciones de reacción, extracción e instrumentales para cada una de las ABs derivatizadas de las formas ligeras y deuterada, combinando de manera efectiva la derivatización química con la separación cromatográfica y detección por espectrometría de masas.

Palabras clave: aminos; derivatización; ligero; pesado.

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL PROCEDURE TO DETERMINE NINE BIOGENIC AMINES BY DERIVATIZATION WITH BENZOYL CHLORIDE (LIGHT/D5) BY HPLC-ESI-ITMS²

Abstract

Biogenic amines (BAs) are nitrogen-containing compounds that, in excess, can cause toxic effects after the consumption of contaminated foods, especially fermented ones. Owing to their high polarity, low volatility, and the complex chemical composition of food matrices, reliable quantification of Bas should be carried out using sufficiently selective and sensitive procedures. The method developed is based on the derivatization of BAs with benzoyl chloride (light and heavy) followed by HPLC-ESI-ITMS/MS analysis. Nine BAs (putrescine, cadaverine, histamine, agmatine, benzylamine, tryptamine, tyramine, spermine, and spermidine) were included and hexamethylenediamine was applied as internal standard helping to eliminate possible imprecisions/errors occurring before derivatization. The derivatization reaction was performed at room temperature, and the obtained products were extracted to CH₂Cl₂. Chromatographic separation was achieved on a C18 column, optimizing the elution gradient with mobile phase A (0.1% FA) and mobile phase B (MeOH) for adequate analyte separation. Detection was carried out in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The experiments performed allowed for establishing the reaction, extraction, and instrumental conditions for each BAs derivatize with both light and deuterated benzoyl chloride, thus effectively combining chemical derivatization with chromatographic separation and mass spectrometry detection.

Keywords: Amines; derivatization; light; heavy.

1. Introducción

Las ABs son compuestos nitrogenados que contienen uno o más grupos amino ($-NH_2$) en su estructura química; son productos de la descarboxilación enzimática de ciertos aminoácidos o pueden formarse por aminación y transaminación de aldehídos y cetonas (Santos, 1996). Estas moléculas actúan como precursores de macromoléculas biológicas y pueden generarse tanto endógenamente como ser ingeridos en alimentos contaminados por acción microbiana. Algunas de las ABs tienen funciones esenciales (síntesis de proteínas, reguladores vasculares, inmunidad, etc.), pero su acumulación excesiva por el consumo de alimentos contaminados (principalmente del tipo fermentado), puede desencadenar efectos tóxicos como reacción alérgica, hipertensión y en casos graves, formación de nitrosaminas carcinógenas (Del Rio y col., 2024). El establecimiento de un estándar de toxicidad para las ABs resulta desafiante, ya que depende de la sensibilidad de cada individuo, el funcionamiento del sistema de desintoxicación individual, medicamentos, etc. Por ello, es necesario contar con procedimientos analíticos que permitan la cuantificación de ABs en matrices alimentarias y que sean adecuados para

evaluar los niveles de exposición en la dieta diaria, establecer patrones de consumo seguros y prevenir que la ingesta total de ABs sobrepase los niveles de tolerancia individual, evitando así efectos adversos sin restringir innecesariamente el consumo de alimentos fermentados. Sin embargo, la cuantificación confiable de ABs en alimentos enfrenta importantes desafíos analíticos debido a: (1) su alta polaridad y baja volatilidad, (2) composición de muestras químicamente compleja, y (3) la necesidad de distinguir isómeros estructurales. En este sentido, el empleo de agentes derivatizantes como cloruro de benzoilo (BnCl) permite convertir a las ABs en compuestos con menor polaridad y mejor volatilidad, adecuados para su separación cromatográfica y detección por espectrometría de masas con ionización por electro nebulización en modo positivo (ESI (+)). Así mismo, el uso de espectrometría de masas como sistema de detección, ofrece la posibilidad de incorporar estándares de analitos marcados con isótopos pesados como estándares internos o como calibradores cuando la determinación se realiza mediante dilución isotópica. Finalmente, la adquisición de las señales en modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) provee excepcionalmente alta selectividad, altos

valores de relación señal/ruido y por ello muy bajos niveles de cuantificación.

El objetivo del trabajo fue poner a punto un procedimiento para la determinación de nueve ABs, las cuales son: putrescina (PUT), cadaverina (CAD), histamina (HIS), agmatina (AGM), bencilamina (BA), triptamina (TRP), tiramina (TYR), espermina (SPM) y espermidina (SPD), además de hexametildiamina (EI) como estándar interno, mediante la derivatización con cloruro de benzoilo ligero (BnCl-d_0) y pesado (BnCl-d_5) y su posterior análisis mediante HPLC-ESI-ITMS/MS en modo MRM.

2. Desarrollo experimental

2.1. Derivatización

Se prepararon soluciones estándar de nueve ABs y un estándar interno, hexametildiamina (EI) con concentración 1 mg/ml. La reacción de derivatización se llevó a cabo con base en el procedimiento desarrollado por (Li y col., 2023). En breve,

una alícuota de 20 μL de una mezcla de ABs y hexametildiamina como EI (10 $\mu\text{g/mL}$) se colocó en un tubo Eppendorff agregando 140 μL de $\text{MeCN/H}_2\text{O}$ 80:20, 80 μL Na_2CO_3 0.1M y 80 μL BnCl-d_0 2% v/v. La reacción se lleva a cabo con agitación por 10 min. Pasado el tiempo, se adicionan 180 μL $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0.2 M. Posteriormente se hace una extracción de los compuestos derivatizados adicionando 0.5 mL de CH_2Cl_2 , se agita con vortex por 25 s, se desecha la fase acuosa y se lleva a secar. El sólido obtenido se disuelve en 300 μL de la fase móvil inicial (55% fase B) para su análisis. Dicho procedimiento se empleó también para la preparación de las ABs derivatizadas con BnCl-d_5 , utilizando un reactivo comercial adquirido de Sigma-Aldrich® (St. Louis, Mo, USA). Para el análisis por HPLC-ESI-ITMS/MS, inicialmente se establecieron las condiciones MRM por infusión directa para los productos de las ABs derivatizadas con cloruro de benzoilo ligero y pesado, mostrados en la tabla 1. Se utilizó un espectrómetro de masas de trampa de iones AmaZon SL equipado con fuente ESI (Bruker Daltonics).

Tabla 1. Condiciones MRM de cada AB derivatizada con BnCl.

AB	T _{ret} (min)	Segmento de tiempo	Cut-Off	Ampl V	Ion precursor r (m/z)	Ion cuantif. (m/z)	Ion cualific. (m/z)
HIS	2.5 ± 0.1	0 -5.0	100	0.3	215.9	197.9	105.1
HIS-d5	2.6 ± 0.1		100	0.3	220.9	202.9	110.1
AGM	2.7 ± 0.1		100	1.1	235.0	174.9	217.9
AGM-d5	2.7 ± 0.1		100	1.1	240.0	179.9	222.9
PUT	6.7 ± 0.1	5.1 – 8.7	80	1.0	297.1	175.9	278.9
PUT-d5	6.6 ± 0.1		80	1.0	307.1	180.9	289.1
BA	7.7 ± 0.1		100	0.3	211.9	105.1	133.9
BA-d5	7.8 ± 0.1		100	0.3	216.9	110.1	138.9
CAD	7.8 ± 0.1	8.8-11.0	84	1.0	311.1	189.9	293.0
CAD-d5	7.9 ± 0.1		84	1.0	321.1	194.9	303.1
TRP	9.3 ± 0.1		100	0.5	265.0	143.9	247.9
TRP-d5	9.3 ± 0.1		100	0.5	270.0	143.9	252.9
EI	10.0 ± 0.1	11.1-16.0	88	1.0	325.2	203.9	307.1
EI-d5	9.8 ± 0.1		88	1.0	335.2	208.9	317.1
SPD	11.9 ± 0.1		124	1.0	458.3	336.2	162.0
SPD-d5	12.0 ± 0.1		124	1.0	473.2	346.2	166.9
SPM	12.9 ± 0.1	11.1-16.0	167	1.0	619.4	497.3	233.0
SPM-d5	12.8 ± 0.1		167	1.0	639.4	512.4	238.1
TYR	13.8 ± 0.1		100	0.8	346.1	224.9	105.1
TYR-d5	13.8 ± 0.1		100	0.8	356.1	229.9	110.1

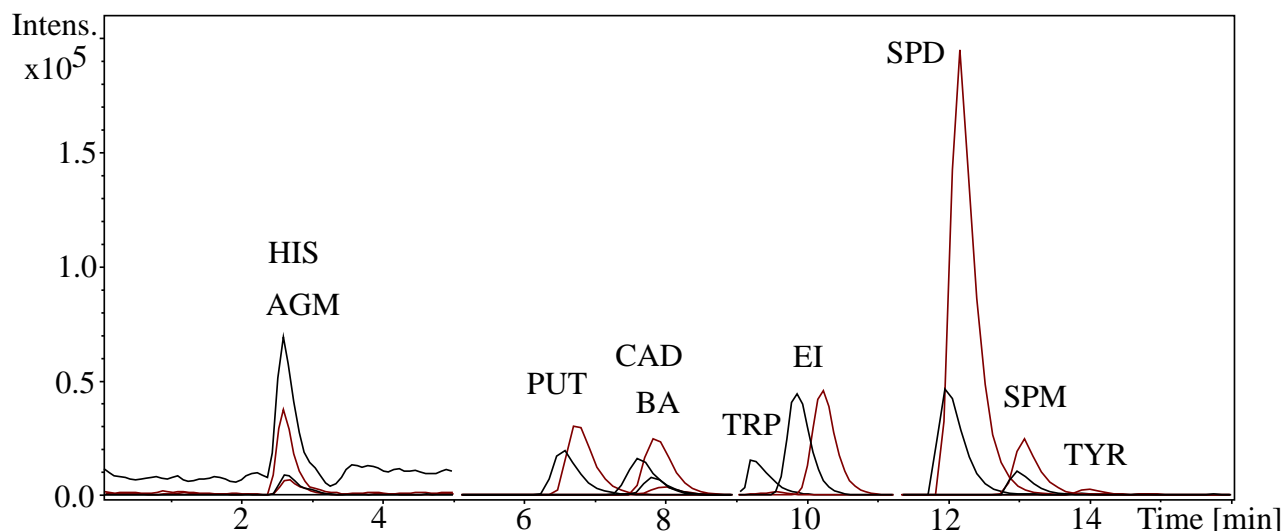


Figura 1. Típico cromatograma adquirido en el modo MRM de una mezcla de ABs derivatizadas con BnCl ligero (rojo) y pesado (negro), 50 ng/ml; EI: 50 ng/ml

En cuanto a la separación cromatográfica, una buena separación se logró usando un cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) con una bomba binaria, un desgasificador, un compartimiento de columna termoestabilizado, junto a una columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 2.1 x 150 mm, 2.7 μ m y las fases móviles de ácido fórmico (AF) 0.1% (fase A) y MeOH (fase B), con una elución en gradiente (tabla 2) con un flujo total en la columna de 0.15 mL/min, volumen de inyección de 2 μ L y temperatura de 35 °C. Los tiempos de retención de solutos individuales se incluyen en tabla 1 junto con los segmentos de tiempo definidos para MRM.

Tabla 2. Gradiente de elución para análisis

Tiempo (min)	7	7.2	13	13.5	16
AF 0.1% % A	45	2	2	45	45
MeOH % B	55	98	98	55	55

Un típico cromatograma adquirido para una mezcla de las nueve ABs derivatizadas con BnCl-d₀ y BnCl-d₅ que contenía hexametildiamina como IS se muestra en la Figura 1. De acuerdo con tabla 1, en cada uno de los segmentos de tiempo se adquirieron datos para dos o tres compuestos; además, se observa la co-elución parcial de HIS y AGM (2.6 - 2.7 min) así como de CAD y BA (7.7 - 7.9 min). Gracias a diferentes transiciones de

iones definidas para cada uno de los compuestos, su cuantificación puede realizarse de manera selectiva y confiable. Los estándares de ABs derivatizadas con BnCl-d₅ pueden servir como estándares internos en calibraciones externas o como calibradores en el método de dilución isotópica. Aunque los isotopólogos pesados de los analitos se consideran como estándares internos idóneos, al introducir el isótopo pesado durante la derivatización, todas las etapas analíticas previas se llevan a cabo sin EI. Por ello, además de usar la estrategia ICD (Isotope Coded Derivarization), se propuso la hexametildiamina como un adicional EI, agregando su alícuota directamente a la muestra. De esta manera se podrá compensar/eliminar imprecisiones cometidas durante todo el procedimiento, incluyendo etapas previas a la derivatización.

Conclusiones

Se ha puesto a punto las condiciones para la derivatización de nueve AB y hexametildiamina como un estándar interno con cloruro de benzoilo. La derivatización codificada por isótopos se logró utilizando el agente derivatizante ligero (BnCl-d₀) y pesado (BnCl-d₅). Se han establecido las condiciones de separación de

los compuestos derivatizados por cromatografía de líquidos y su detección por espectrometría de masas con adquisición de señales en modo MRM (HPLC-ESI(+)-ITMS/MS). El procedimiento será utilizado para el análisis de cervezas artesanales del estado de Guanajuato. Para ello, será necesario establecer un procedimiento de tratamiento de muestra que permita la extracción de las ABs, evitando así interferencias provocadas por efecto de matriz, además del establecimiento de los límites de detección y cuantificación del procedimiento analítico aquí propuesto.

Agradecimientos

Este estudio se realizó con el apoyo SECIHTI, mediante proyecto CBF-2025-6-383, Apoyo LN-2025-C-91.

Referencias bibliográficas

Del Rio, B., Fernandez, M., Redruello, B., Ladero, V., & Alvarez, M. A. (2024). New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. *Food Chem*, 435, 137558. doi:10.1016/j.foodchem.2023.137558

Li, T., Wang, R., & Wang, P. (2023). The Development of an Ultra-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method for Biogenic Amines in Fish Samples. *Molecules*, 28(1), 184.

Santos, M. H. S. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 213-231.