

4. VALIDACIÓN DE LA  
METODOLOGÍA  
ANALÍTICA Y  
APLICACIÓN A  
ALIMENTOS CÁRNICOS

---



## 4.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los trabajos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en Aminas Heterocíclicas nos han permitido participar en un proyecto europeo titulado “Heterocyclic Amines in Cooked Foods -- Role in Human Health” (QLK1-CT99-01197, 1999), en el cual están implicados otros nueve laboratorios europeos. Dicho proyecto tenía como objetivo global aumentar el conocimiento sobre los efectos en la salud derivados de la exposición a las HAs. Con este fin, se plantearon tres aspectos a investigar, los cuales se detallan a continuación.

El primer objetivo consistía en el establecimiento de los niveles de exposición a los analitos. Con este fin, se planteó el establecimiento de un método de análisis estándar de HAs en alimentos y también el desarrollo de metodología que permitiera analizar biomarcadores de exposición. También se propuso llevar a cabo encuestas de frecuencia de consumo de alimentos, ya que la información extraída de estos cuestionarios combinada con los niveles de concentración de las HAs en las muestras pueden permitir calcular los valores de ingesta diaria de cada analito.

El segundo aspecto a investigar en el proyecto consistía en el estudio de los factores endógenos que pueden modificar los efectos derivados de la exposición a las HAs. Con este objetivo se planteó en primer lugar estudiar la función de la flora bacteriana existente en el intestino utilizando para ello modelos animales. Otro objetivo era definir las enzimas implicadas en el metabolismo de los analitos y estudiar las características genéticas que originan los diferentes polimorfismos. También se consideró fundamental investigar de la capacidad individual para eliminar o reparar las mutaciones producidas por las HAs.

El último punto investigado consistió en evaluar los factores exógenos (de la dieta) que pueden estar implicados en la modificación de los efectos en la salud de las HAs. Para ello se deben establecer ensayos *in vivo* e *in vitro* que permitan identificar constituyentes de la dieta con efectos protectores.

De entre estos aspectos, nuestro laboratorio ha colaborado en la determinación de los niveles de exposición a las HAs a través de la ingesta de alimentos. En primer lugar, nuestro grupo de investigación ha sido el responsable de establecer metodología analítica adecuada para el análisis de HAs en alimentos. Nuestro grupo se ha encargado también de realizar encuestas de frecuencia de consumo de alimentos, en las cuales se debía

especificar además el modo de cocinado del alimento y el grado de cocción. Una vez identificados los platos más consumidos, hubo de determinarse la concentración de las HAs en cada una de las muestras, lo que permitió estimar el valor de ingesta diaria de los analitos.

El establecimiento de un método de análisis que permitiera cuantificar las HAs en alimentos implicó la organización de una serie de ejercicios de intercomparación. Para realizar el primero de ellos, nuestro laboratorio preparó una disolución metanólica que contenía once HAs (IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C y MeA $\alpha$ C) a un nivel de concentración de 0,8-2  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Tras comprobar su homogeneidad y estabilidad, la disolución se envió a los diferentes laboratorios participantes con el fin de evaluar la validez de los métodos de determinación aplicados en el análisis. A continuación, con el fin de estudiar la metodología de preparación de muestra, se prepararon tres lotes de extracto de ternera liofilizado. El primero de ellos, denominado Lote A, contenía cinco analitos (IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP y A $\alpha$ C) a un nivel de concentración relativamente elevado (45-65  $\text{ng g}^{-1}$ ). El siguiente lote, designado como Lote B, se contaminó con diez HAs (IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, PhIP, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1 y Trp-P-2) a un nivel de concentración algo mayor (60-90  $\text{ng g}^{-1}$ ). El tercer lote, el Lote C, contenía los mismos analitos que el Lote B pero esta vez a un nivel de concentración menor (5-25  $\text{ng g}^{-1}$ ). Una vez comprobada la homogeneidad y estabilidad de los diferentes materiales, se organizaron tres ejercicios interlaboratorio en los que se analizaron los diferentes lotes de extracto de carne.

El trabajo experimental incluido en el presente capítulo tiene relación con el proyecto europeo comentado, ya que ha consistido en el análisis de las muestras correspondientes a los ejercicios de intercomparación con la finalidad de validar la metodología analítica desarrollada en esta memoria. Los resultados obtenidos se recogen en el Apartado 4.2.

En la segunda parte de este capítulo y tras identificar la ternera a la plancha como uno de los alimentos cárnicos más consumidos en el área de Barcelona, nos propusimos analizar el contenido de HAs en diversas muestras de este plato, algunas cocinadas por nosotros y otras procedentes de restaurantes. El trabajo resultante se incluye en el Apartado 4.3 del presente capítulo en forma de un artículo titulado "*Heterocyclic amines in griddled beef steak using a single extract clean-up procedure*" que ha sido enviado para su publicación en la revista *Food and Chemical Toxicology*.

## 4.2. EJERCICIOS DE INTERCOMPARACIÓN

### 4.2.1. Introducción y objetivos

La etapa inicial en la validación de los métodos de análisis establecidos en esta memoria fue la evaluación de la variabilidad debida al método de análisis utilizado. Para ello, se realizó un primer ejercicio interlaboratorio en el cual se determinó el contenido de HAs en la disolución de referencia presentada anteriormente. A continuación y con el fin de evaluar los procedimientos de tratamiento de muestra, se participó en los ejercicios de intercomparación que tenían como objetivo la determinación de diferentes HAs en los extractos de vacuno liofilizados preparados por nuestro laboratorio. El orden de análisis de los tres lotes fue en orden creciente de dificultad. Es decir, en primer lugar se distribuyó el Lote A, que contenía tan sólo cinco analitos a un nivel de concentración relativamente elevado. En el siguiente ejercicio se hizo entrega del Lote B, que contenía diez HAs a un nivel de concentración también elevado. Finalmente, se analizó el Lote C, que contenía también diez HAs pero esta vez a una concentración baja.

Para la cuantificación de los analitos en la disolución de referencia se utilizaron el método LC-UV incluido en el Apartado 3.2.2.1 y los métodos LC-MS desarrollados en el Capítulo 3. En el caso de analizar el extracto de carne liofilizado, se descartó el uso de la detección UV por su baja selectividad. El procedimiento de tratamiento de muestra empleado para extraer y purificar los analitos de los extractos de carne consistió en el desarrollado en el Capítulo 2 de la memoria, que consigue reunir todas las HAs en un único extracto mediante el uso de un cartucho PRS en forma ácida.

### 4.2.2. Trabajo experimental

#### 4.2.2.1. Análisis de una disolución de referencia

La disolución analizada consistió en una disolución metanólica que contenía once analitos (IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C y MeA $\alpha$ C) a un nivel de concentración de  $\sim 1,4 \mu\text{g g}^{-1}$ . Se prepararon seis diluciones de la disolución problema mediante la adición de la cantidad adecuada de patrón interno (TriMeIQx). Para la calibración del sistema analítico, se utilizaron seis disoluciones patrón que contenían a su vez la misma cantidad de patrón interno que las muestras ( $\sim 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ )

y que cubrían ampliamente el intervalo de concentraciones de las HAs en la disolución a analizar ( $0,05\text{-}2 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Para la cuantificación de los analitos en la muestra se utilizaron varios de los métodos cromatográficos desarrollados anteriormente en la memoria. El primero de ellos fue el método LC-UV descrito en el Apartado 3.2.2.1, empleando el gradiente ternario basado en ácido fórmico y acetonitrilo. Se utilizaron también los métodos LC-MS y LC-MS/MS con el instrumento de trampa de iones, los cuales se han descrito en los Apartados 3.2.2.2 y 3.2.2.4 de la memoria. Finalmente, los análisis se realizaron también con el instrumento de triple cuadrupolo (Apartado 3.3.2.1 del Capítulo 3). Para cada uno de los métodos utilizados, el análisis se realizó en dos días consecutivos, inyectando cada día los estándares de calibración, un blanco del sistema y tres muestras. En la Figura 4.1 se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos al inyectar la disolución problema en el sistema LC-MS(IT).

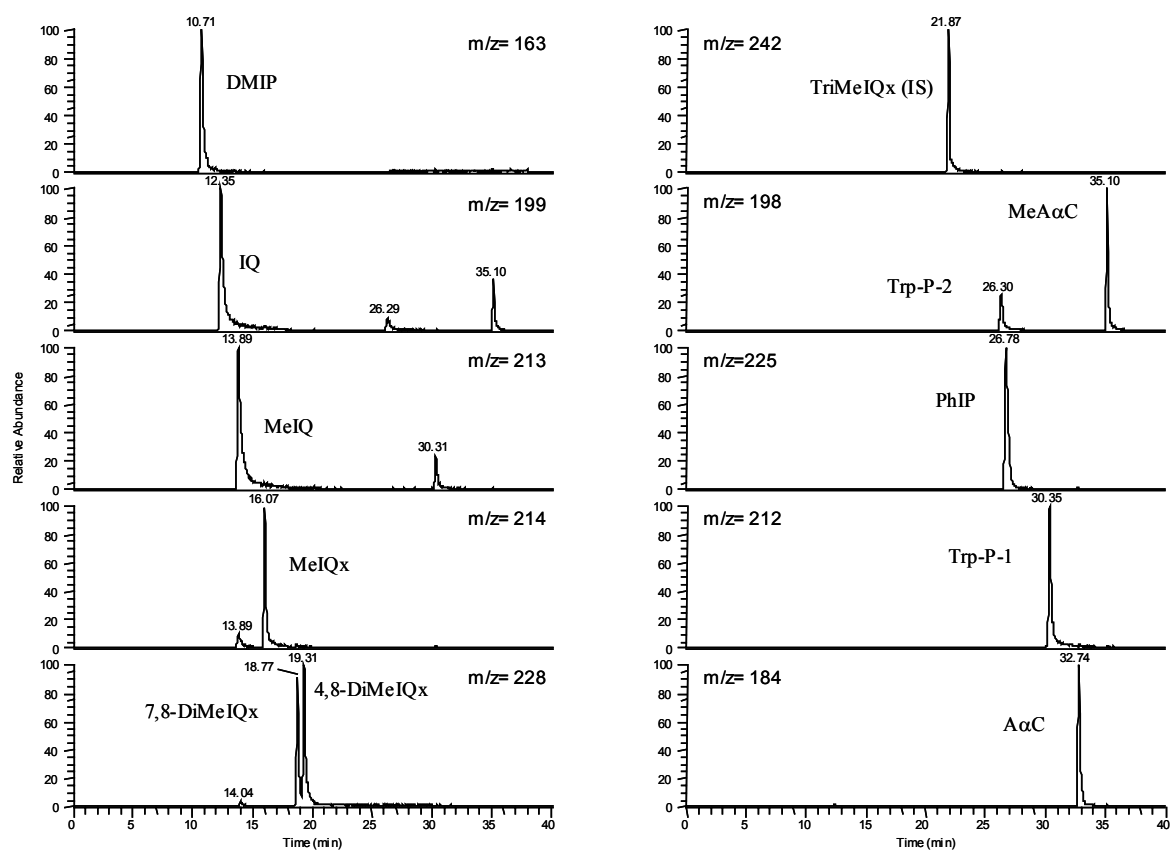


Figura 4.1.- Cromatogramas obtenidos al analizar mediante LC-MS(IT) las HAs presentes en una disolución de referencia. Condiciones de trabajo: elución por gradiente ternario basado en mezclas fórmico/fórmico y acetonitrilo y utilizando una columna en fase invertida. Para mayor detalle consultar el Apartado 3.2.2.2 incluido en el Capítulo 3 de la memoria.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la disolución problema con los diferentes métodos cromatográficos utilizados por nuestro laboratorio se presentan en la Tabla 4.1, donde además se incluyen los valores teóricos de concentración para cada uno de los analitos. En dicha tabla puede apreciarse que la desviación estándar relativa obtenida ha sido en todos los casos inferior al 11%. En referencia a la exactitud de los métodos empleados, la diferencia relativa porcentual respecto al valor teórico ha sido únicamente superior al 10 % para las quinolinas (IQ, MeIQ) y las  $\alpha$ -carbolinas (A $\alpha$ C y MeA $\alpha$ C) utilizando detección UV y para MeIQx con el método LC-MS en el triple cuadrupolo. En el caso del análisis por UV, esta desviación del valor real puede ser debida a deformaciones de la línea de base debidas a la elución por gradiente. Para MeIQx analizada por LC-MS con el instrumento de triple cuadrupolo, la menor exactitud se debe a la existencia de una importante interferencia en este sistema cromatográfico, como se comentó en el Apartado 3.4.1 de la memoria. Un análisis de la varianza de dos factores (muestra y método) demostró que, a excepción de los casos anteriormente mencionados que superaban el 10 % de error, los resultados obtenidos con los diferentes métodos eran equivalentes entre si y concordaban además con el valor teórico, lo que demuestra que tanto el método LC-UV como los métodos LC-MS empleados en el análisis pueden proponerse para la determinación de HAs en disoluciones metanólicas si el nivel de concentración de los analitos es adecuado para el método utilizado.

A modo de ejemplo, en las Figuras 4.2 y 4.3 se muestran los resultados obtenidos en el ejercicio interlaboratorio para varias de las HAs analizadas en la disolución de referencia. Los laboratorios participantes fueron cuatro, y la mayoría de ellos utilizaron más de un método de análisis. Así, los análisis identificados como 3, 5 y 7 fueron realizados en diferentes laboratorios aplicando métodos LC-UV, mientras que los resultados de los análisis 6 y 8 se obtuvieron mediante LC-ED y LC-FD, respectivamente. En el resto de análisis se aplicaron métodos LC-MS, entre ellos el análisis indicado como 2 corresponde a los resultados entregados por nuestro laboratorio y obtenidos con el método LC-MS/MS(IT). En las gráficas presentadas se muestra también el valor teórico de concentración y el valor medio de las medias obtenidas.

Tabla 4.1.- Concentraciones de las diferentes HAs ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en la disolución de referencia obtenidas al utilizar las técnicas LC-UV y LC-MS desarrolladas en la memoria.

Analitos	LC-UV		LC-MS(IT)		LC-MS/MS(IT) <sup>a</sup>		LC-MS(QqQ)		LC-MS/MS(QqQ)		Valor teórico
	media	RSD %	media	RSD %	media	RSD %	media	RSD %	media	RSD %	
DMIP	1,36	10,3	1,43	4,0	1,45	6,7	1,39	8,4	1,48	8,2	1,431
IQ	1,59	10,7	1,96	3,1	1,90	4,4	1,86	4,4	1,85	6,4	1,841
MeIQ	1,11	10,8	1,52	3,9	1,53	5,9	1,44	7,9	1,44	8,2	1,440
MeIQx	1,26	5,6	1,44	2,8	1,42	4,9	1,18 <sup>b</sup>	10,2 <sup>b</sup>	1,38	7,2	1,355
7,8-DiMeIQx	1,28	4,7	1,43	1,0	1,47	2,5	1,33	6,8	1,45	7,3	1,354
4,8-DiMeIQx	1,32	3,8	1,44	3,1	1,46	2,5	1,36	7,8	1,47	7,1	1,417
Trp-P-2	1,07	3,7	1,17	4,0	1,16	3,0	1,08	5,1	1,09	9,6	1,144
PhIP	1,06	5,7	1,24	2,3	1,25	2,6	1,09	3,8	1,12	5,3	1,172
Trp-P-1	1,10	2,7	1,09	4,0	1,06	6,1	1,09	9,1	1,13	6,0	1,109
A $\alpha$ C	1,72	1,7	1,57	2,2	1,59	4,7	1,51	6,4	1,55	4,9	1,487
MeA $\alpha$ C	1,91	1,6	1,63	2,5	1,59	2,5	1,55	9,6	1,62	7,5	1,550

<sup>a</sup> Valores entregados en el ejercicio interlaboratorio.

<sup>b</sup> Interferencia.

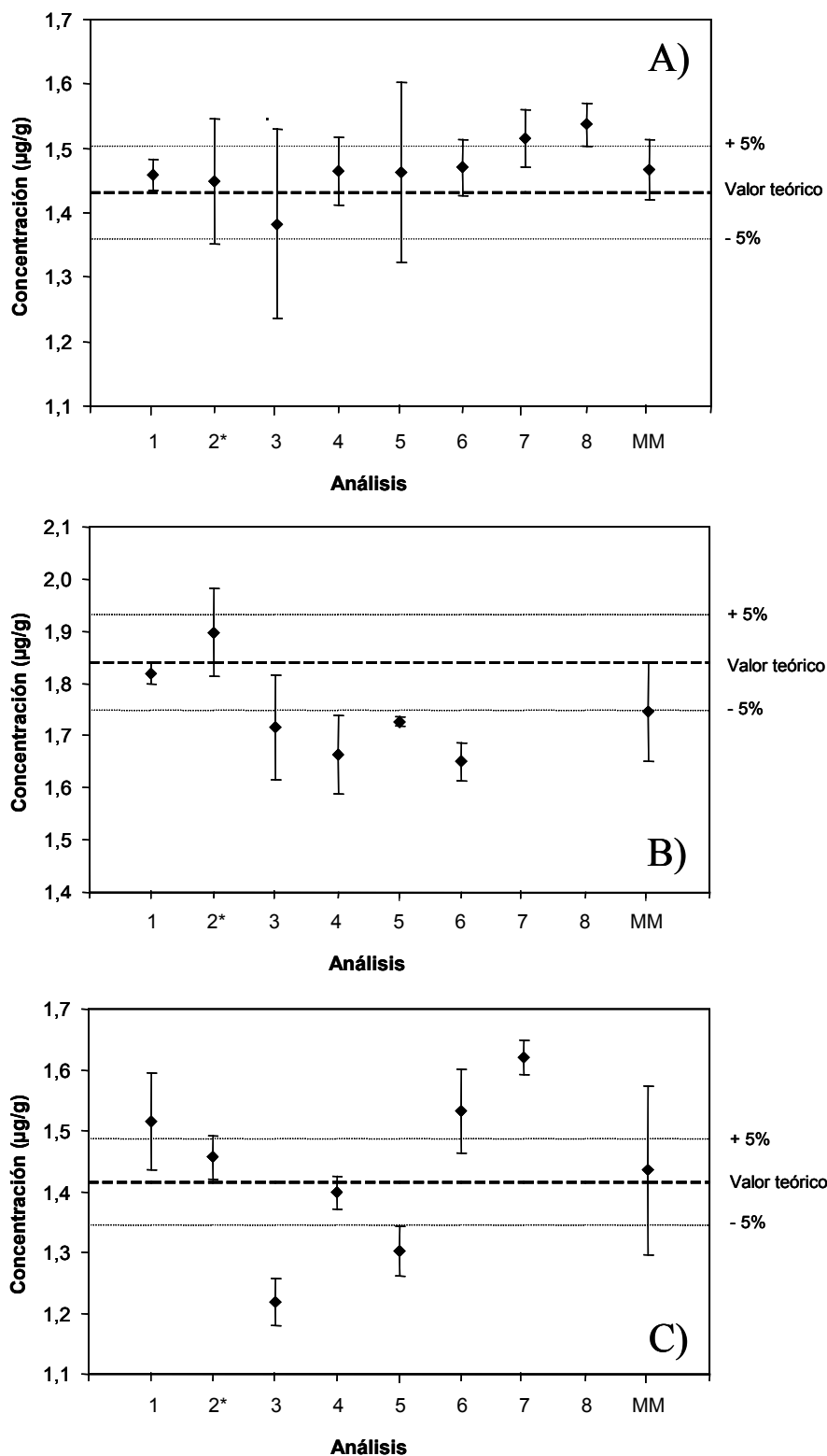


Figura 4.2.- Diagramas correspondientes a los resultados obtenidos por los laboratorios participantes para el análisis de A) DMIP, B) IQ y C) 4,8-DiMeIQx en la disolución de referencia. MM: media de las medias. Las horquillas mostradas para cada valor corresponden al valor respectivo de desviación estándar. \* Resultado entregado por nuestro laboratorio.

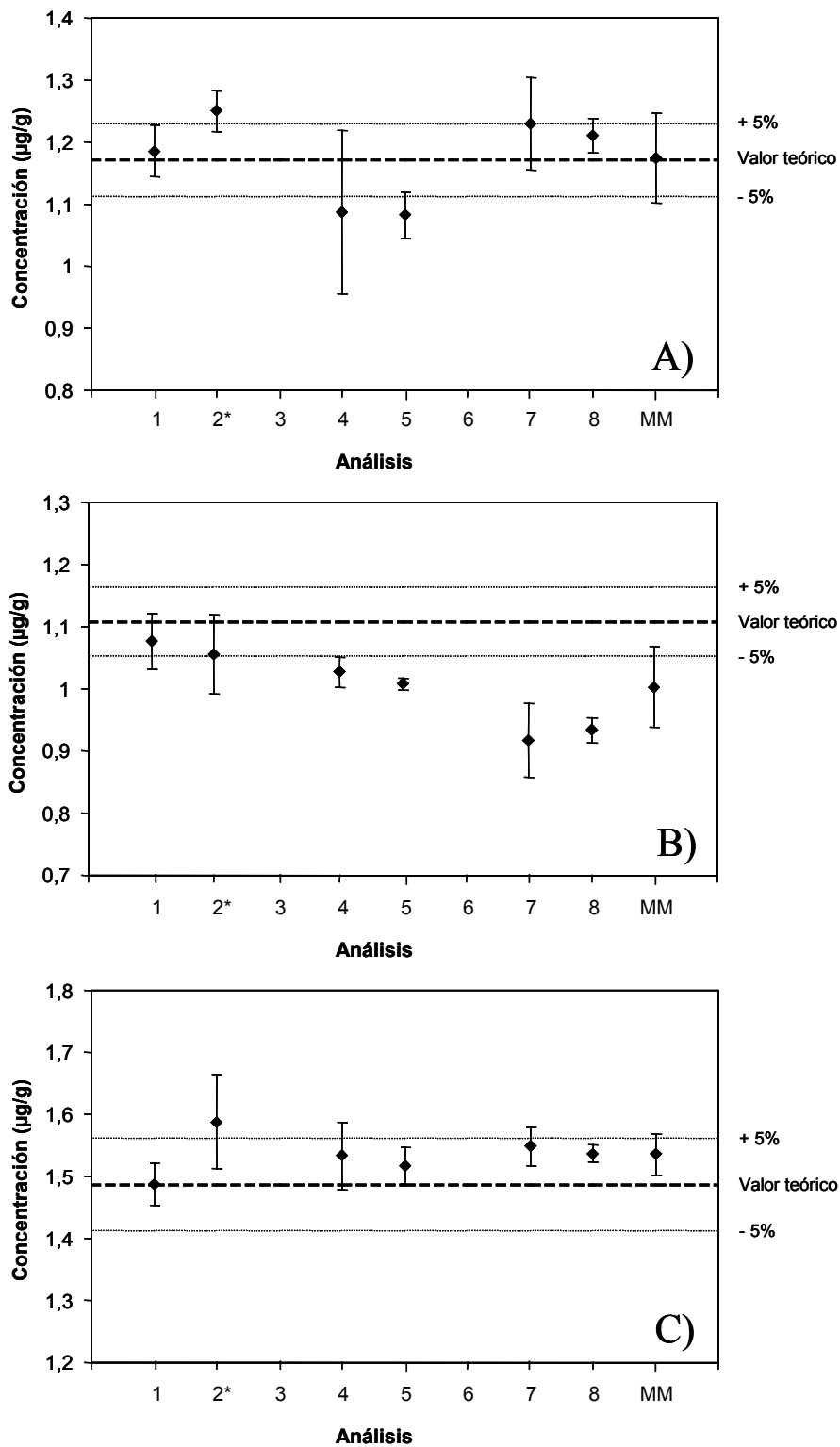


Figura 4.3.- Diagramas correspondientes a los resultados obtenidos por los laboratorios participantes para el análisis de A) PhIP, B) Trp-P-1 y C) AαC en la disolución de referencia. MM: media de las medias. Las horquillas mostradas para cada valor corresponden al valor respectivo de desviación estándar. \* Resultado entregado por nuestro laboratorio.

#### 4.2.2.2. Análisis del Lote A

Con el fin de validar el procedimiento de tratamiento de muestra que permite obtener un único extracto puesto a punto en el Capítulo 2 de esta memoria y para estudiar de qué manera puede afectar el método de *clean-up* en los resultados obtenidos por los métodos LC-MS validados con una disolución patrón en el apartado precedente, se ha analizado el material de referencia interno designado como Lote A utilizando la citada metodología analítica. Se realizaron tres determinaciones independientes, una de cada uno de los viales de muestra suministrados, utilizando el método se las adiciones estándar. En todos los casos, se añadieron también IQ, MeIQx y PhIP trideuteradas a un nivel de concentración de  $100 \text{ ng g}^{-1}$  con el fin de cuantificar los respectivos analitos nativos mediante dilución isotópica y comparar los resultados obtenidos. La eficiencia del procedimiento de extracción y purificación aplicado se estimó para cada analito utilizando una recta de calibrado externa con patrón interno (TriMeIQx). Cada uno de los extractos obtenidos se analizó empleando los métodos LC-MS y LC-MS/MS en el instrumento de trampa de iones (Apartados 3.2.2.2 y 3.2.2.4) y en el de triple cuadrupolo (Apartado 3.3.2.1). Se descartó el uso de la detección UV por su insuficiente selectividad en el análisis de muestras tan complejas. Para cada uno de los métodos cromatográficos de análisis utilizados, se inyectaron a diario durante tres días los patrones de la recta de calibrado seguidos de los seis extractos de uno de los análisis y de un blanco del sistema.

En la Tabla 4.2 se resumen los resultados de los análisis realizados. Para poder estimar el buen funcionamiento de los diferentes métodos de LC-MS, se han comparado los valores medios con los obtenidos a partir de los resultados de todos los laboratorios participantes en el ejercicio, los cuales también se incluyen en la Tabla 4.2. Este estudio nos ha permitido poner de manifiesto una serie de problemas. En primer lugar, se observó que los valores de concentración calculados para algunas HAs eran menores al utilizar el instrumento de trampa de iones, lo que se relacionó con la curvatura de la recta de adición estándar obtenida utilizando TriMeIQx como patrón interno. Este fenómeno de pérdida de linealidad en el analizador de trampa de iones se puede evitar disminuyendo la concentración de las HAs en el extracto a inyectar cuando sea necesario.

Otro de los problemas observados fue que, tanto para el instrumento de trampa de iones como el de triple cuadrupolo, los valores de concentración de IQ calculados mediante dilución isotópica eran mayores en el modo MS que en el modo MS/MS. Esto puede ser debido a la existencia de una sustancia que eluye muy cerca de  $D_3$ -IQ (Figura 4.4), lo cual

dificulta la integración de este patrón trideuterado en el modo MS y puede conducir a un error de cuantificación.

Por último, la cuantificación de MeIQx mediante el método LC-MS(QqQ) estuvo dificultada por la existencia de un abundante ion con la misma  $m/z$  que el analito, tal y como ya se ha expuesto en el Apartado 3.4.1. Como se ha comentado para el análisis de la disolución de referencia (Apartado 4.2.2.1), esta interferencia provoca que la desviación estándar de los valores de concentración calculados sea elevada.

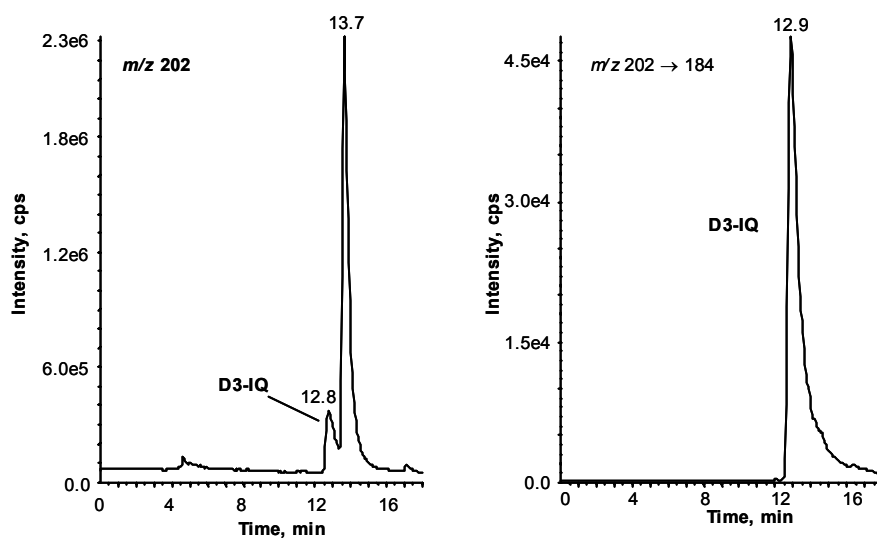


Figura 4.4.- Cromatogramas obtenidos al analizar una muestra mediante A) LC-MS(QqQ) y B) LC-MS/MS(QqQ). Condiciones experimentales: elución por gradiente basado en mezclas fórmico/formiato y acetonitrilo y utilizando una columna en fase invertida. Para mayor detalle, consultar el Apartado 3.3.2.1.

A pesar de estos problemas, los intervalos de confianza calculados para cada uno de los valores ( $n= 6$ ,  $\alpha= 0,05$ ) indican que las diferencias observadas no son significativas. Los valores de concentración obtenidos para cada analito son además similares a la media obtenida a partir de los resultados presentados en el ejercicio interlaboratorio. Por otro lado, casi todos los valores de RSD han sido inferiores al 15%, superándose únicamente ese valor en el caso de MeIQx determinada mediante LC-MS(QqQ) debido a la existencia de la especie interferente. Además, el uso de compuestos trideuterados ha posibilitado una mayor precisión en la cuantificación de los respectivos analitos nativos, tal y como se puede deducir de los valores mostrado en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Concentraciones de las HAs requeridas en el Lote A, utilizando las técnicas de análisis LC-MS desarrolladas en la memoria.

Métodos	IQ		MeIQ		MeIQx		PhIP		AαC	
	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %
LC-MS(IT)	32,8	7,5	39,0	14,9	42,8	10,7	37,7	10,5	39,9	14,6
LC-MS(IT) <sup>a</sup>	49,4	3,0	-	-	53,8	3,1	45,1	2,9	-	-
LC-MS/MS(IT)	28,7	7,3	31,0 <sup>c</sup>	11,3 <sup>c</sup>	41,2	13,6	36,2	15,8	42,8 <sup>c</sup>	15,7 <sup>c</sup>
LC-MS/MS(IT) <sup>a</sup>	40,2 <sup>c</sup>	7,2 <sup>c</sup>	-	-	47,9 <sup>c</sup>	10,2 <sup>c</sup>	44,8 <sup>c</sup>	5,3 <sup>c</sup>	-	-
LC-MS(QqQ)	46,2	13,1	45,2	5,1	39,7 <sup>d</sup>	42,2 <sup>d</sup>	41,7	9,2	47,2	8,6
LC-MS(QqQ) <sup>a</sup>	54,1	4,5	-	-	42,1 <sup>d</sup>	28,8 <sup>d</sup>	43,1	2,4	-	-
LC-MS/MS(QqQ)	43,1	14,2	40,3	10,4	51,9	13,7	39,7	9,2	62,4	6,6
LC-MS/MS(QqQ) <sup>a</sup>	46,1	3,3	-	-	52,3	3,8	43,0	7,6	-	-
Media de las medias <sup>b</sup>	39,6	22,4	38,1	12,7	43,2	25,5	40,4	11,6	38,8	22,9

<sup>a</sup> Valores obtenidos utilizando el método de dilución isotópica.

<sup>b</sup> Valores obtenidos a partir de los datos proporcionados por los diferentes laboratorios participantes (n=5 para MeIQ; n=6 para IQ, MeIQx, PhIP y AαC).

<sup>c</sup> Valores presentados en el ejercicio interlaboratorio.

<sup>d</sup> Interferencia.

## 4.2.2.3. Análisis del Lote B

El objetivo del segundo ejercicio interlaboratorio fue extender el estudio a un número elevado de analitos. Para ello se analizó el material de referencia denominado Lote B, que contenía IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, PhIP, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1 y Trp-P-2 a un nivel de concentración de 60-90 ng g<sup>-1</sup>. Al igual que en el análisis del Lote A, se realizaron tres análisis independientes utilizando el método de las adiciones estándar. Se adicionaron también IQ, MeIQx y PhIP trideuteradas a un nivel de concentración de 120 ng g<sup>-1</sup> para cuantificar los respectivos analitos nativos mediante dilución isotópica, y el método de extracción y purificación aplicado fue el de un solo extracto optimizado en esta memoria. Por disponibilidad de instrumentación, los análisis se realizaron por LC-MS y LC-MS/MS utilizando el instrumento cuadrupolar (Apartado 3.3.2.1). A modo de ejemplo, en la Figura 4.5 se muestran los cromatogramas obtenidos al utilizar el método cromatográfico LC-MS/MS.

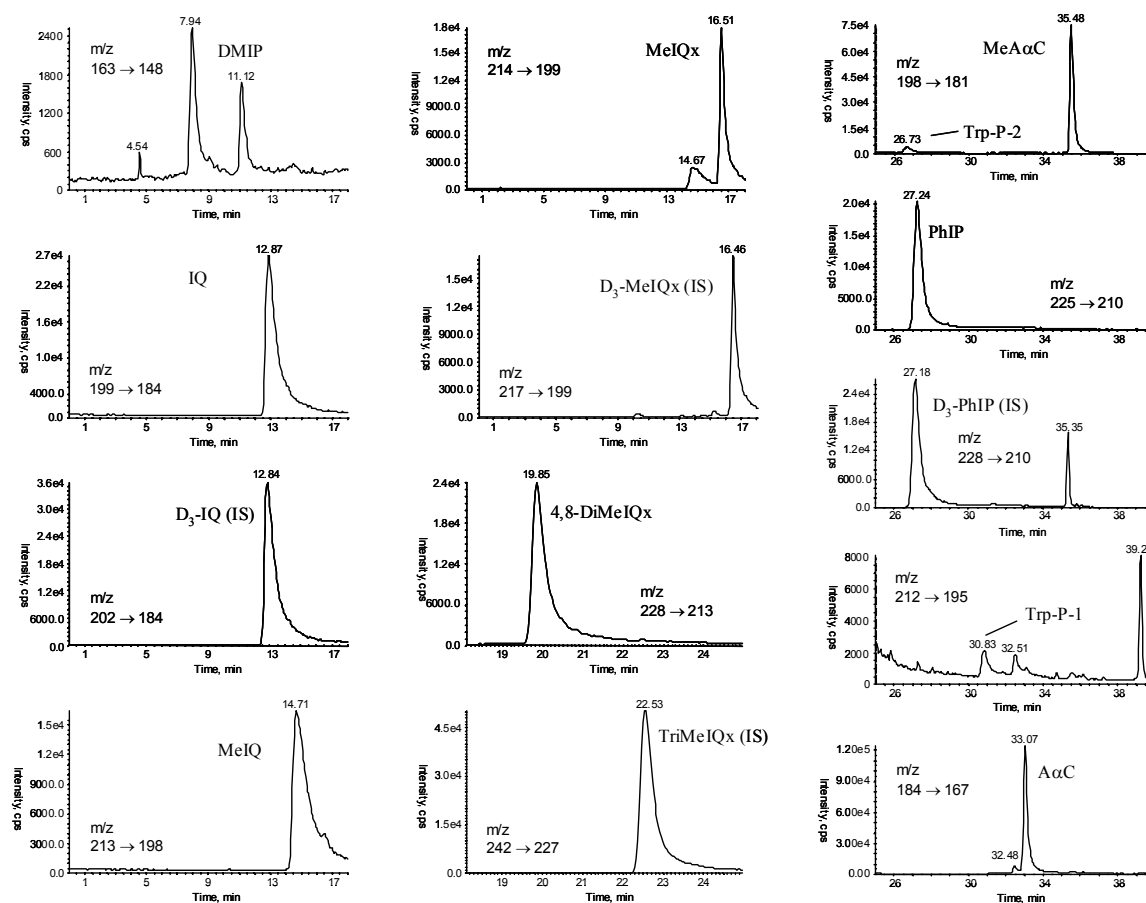


Figura 4.5.- Cromatogramas LC-MS/MS(QqQ) obtenidos en el análisis del Lote B. Condiciones experimentales: elución por gradiente fórmico/formiato y acetonitrilo utilizando una columna en fase invertida. Para mayor detalle consultar Apartado 3.3.2.1.

En la Tabla 4.3 se resumen los resultados obtenidos. Además, se han incluido en la tabla los promedios del conjunto de valores aceptados como válidos obtenidos en el ejercicio interlaboratorio. En general, los niveles de concentración de las diferentes HAs analizadas fueron coherentes para los dos instrumentos utilizados, y los valores de RSD estuvieron generalmente por debajo del 15%. También se observó una elevada concordancia de los datos con los valores promedio calculados para todos los laboratorios, excepto para la Trp-P-1 y la Trp-P-2. Los valores anormalmente bajos obtenidos para estos dos compuestos pueden deberse a las bajas recuperaciones obtenidas (<25%). El descenso en la recuperación de las  $\gamma$ -carbolinas se demostró era debido a modificaciones realizadas por el fabricante en el adsorbente utilizado como intercambiador catiónico, que era Isolute SCX-2 (IST, Hengoes, UK). Excepto para DMIP, cuya recuperación fue del ~20%, las demás HAs fueron recuperadas con eficiencias superiores al 70 %. Por otro lado y como era de esperar, el uso de analitos marcados isotópicamente posibilitó la obtención de datos más precisos que los obtenidos con el método de adición estándar.

En las Figuras 4.6 y 4.7 se muestran a modo de ejemplo los resultados del ejercicio interlaboratorio para varios de los compuestos determinados. En dichos diagramas, los análisis identificados como 1-4 utilizaron métodos LC-MS. Entre ellos, el número 2 fue el realizado por nuestro laboratorio utilizando el instrumento de triple cuadrupolo en modo tándem. Además, los datos correspondientes a IQ, MeIQx y PhIP son los obtenidos utilizando dilución isotópica, dado que este método permite obtener mejores resultados. El resto de análisis fueron realizados por los otros laboratorios participantes utilizando detección ED (análisis 5) y FD (análisis 6). Excepto los análisis 2 y 4, todos los demás se llevaron a cabo utilizando el procedimiento de *clean-up* de dos extractos (Gross *et al.*, 1992; Galceran *et al.*, 1996). En nuestro caso (análisis 2), el tratamiento de muestra fue el desarrollado por nosotros y que proporciona un único extracto utilizando un cartucho de intercambio iónico de base sílice, mientras que el análisis 4 se basó en el uso de un adsorbente polimérico para obtener también un solo extracto.

Como puede observarse en los diagramas mostrados, los resultados obtenidos por nuestro laboratorio son concordantes con el valor promedio global considerando la desviación estándar de la media de los laboratorios. Además, aunque el otro método de tratamiento de muestra de un solo extracto (análisis 4) proporciona también resultados satisfactorios, la precisión correspondiente es menor que la del método propuesto por nosotros.

Tabla 4.3.- Concentraciones de las diferentes HAS analizadas en el Lote B obtenidas al utilizar técnicas de análisis LC-MS desarrolladas en la memoria.

Analitos	LC-MS(QqQ)		LC-MS(QqQ) <sup>a</sup>		LC-MS/MS(QqQ)		LC-MS/MS(QqQ) <sup>a</sup>		media de las medias <sup>b</sup>	RSD % de las medias <sup>b</sup>
	media	RSD %	media	RSD %	media	RSD %	media	RSD %		
DMIP	70,4	30,8	-	-	62,4 <sup>d</sup>	35,1 <sup>d</sup>	-	-	68,1	13,4
IQ	66,6	5,5	73,6	4,2	71,0	12,0	71,4 <sup>d</sup>	3,4 <sup>d</sup>	64,5	13,6
MeIQ	58,8	11,6	-	-	61,2 <sup>d</sup>	11,4 <sup>d</sup>	-	-	63,6	18,2
MeIQx	64,6 <sup>c</sup>	40,4 <sup>c</sup>	72,6 <sup>c</sup>	20,4 <sup>c</sup>	83,1	12,1	81,6 <sup>d</sup>	1,6 <sup>d</sup>	64,5	24,1
4,8-DiMeIQx	54,7	12,4	-	-	56,9 <sup>d</sup>	10,1 <sup>d</sup>	-	-	71,6	12,1
Trp-P-2	24,7	52,0	-	-	31,6 <sup>d</sup>	24,0 <sup>d</sup>	-	-	68,6	17,7
PhIP	63,1	9,6	69,6	8,5	61,3	5,7	64,9 <sup>d</sup>	1,8 <sup>d</sup>	71,9	13,3
Trp-P-1	19,9	64,5	-	-	29,0 <sup>d</sup>	34,6 <sup>d</sup>	-	-	71,4	14,9
A $\alpha$ C	60,2	7,3	-	-	68,7 <sup>d</sup>	13,4 <sup>d</sup>	-	-	72,0	9,2
MeA $\alpha$ C	74,5	5,9	-	-	64,4 <sup>d</sup>	12,2 <sup>d</sup>	-	-	70,8	8,3

<sup>a</sup> Valores calculados utilizando el método de dilución isotópica.

<sup>b</sup> Valores calculados a partir de los datos proporcionados por los diferentes laboratorios participantes (n=4 para DMIP, 4,8-DiMeIQx, Trp-P-2 y MeA $\alpha$ C; n=5 para IQ, MeIQ, MeIQx, Trp-P-1 y A $\alpha$ C; n=6 para PhIP).

<sup>c</sup> Interferencia.

<sup>d</sup> Valores entregados en el ejercicio interlaboratorio.

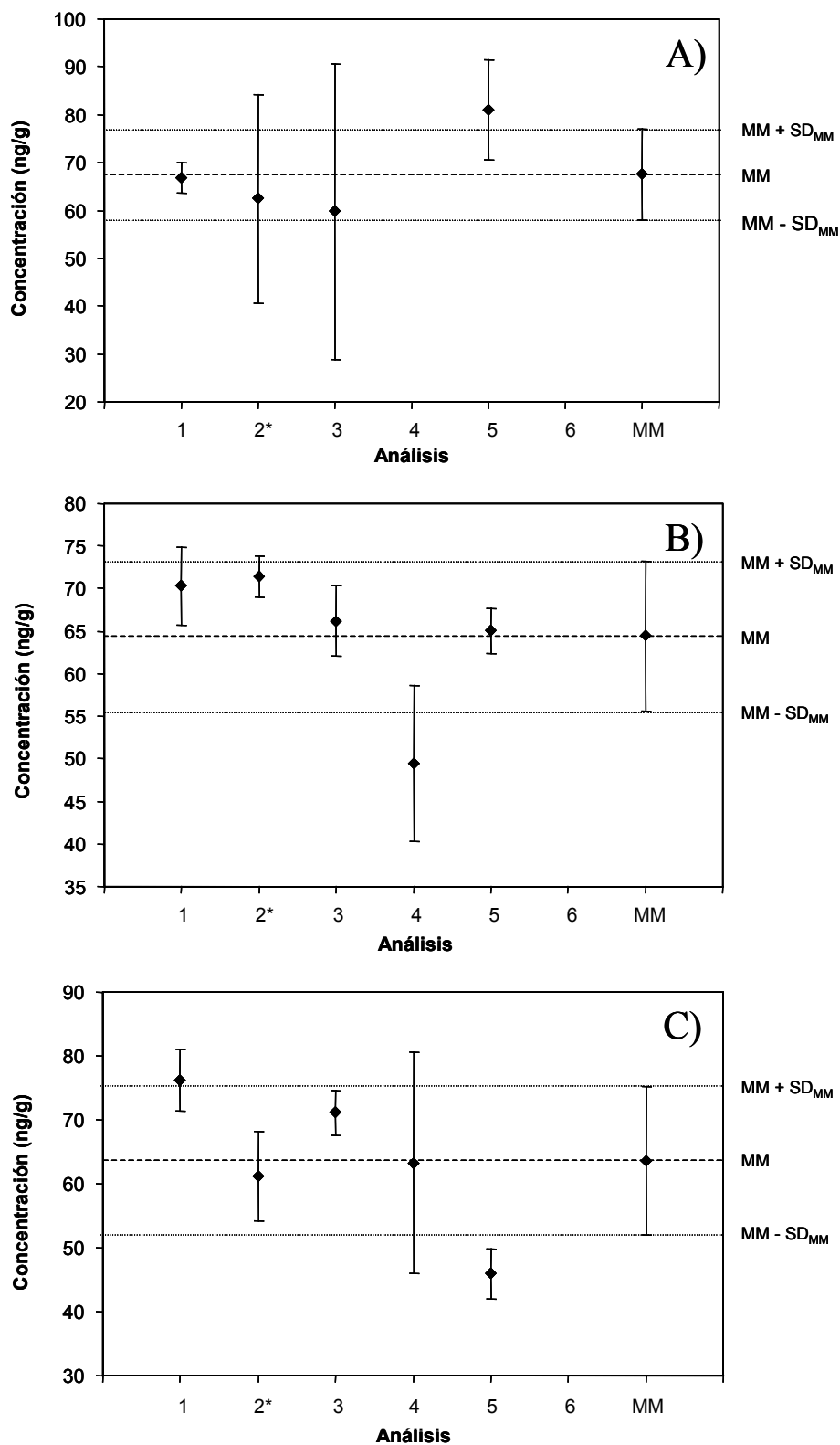


Figura 4.6.- Diagramas correspondientes a los resultados obtenidos por los laboratorios participantes para el análisis de A) DMIP, B) IQ y C) MeIQ en el Lote B. MM: media de las medias. Las horquillas mostradas para cada valor corresponden al valor respectivo de desviación estándar. \* Resultado entregado por nuestro laboratorio.

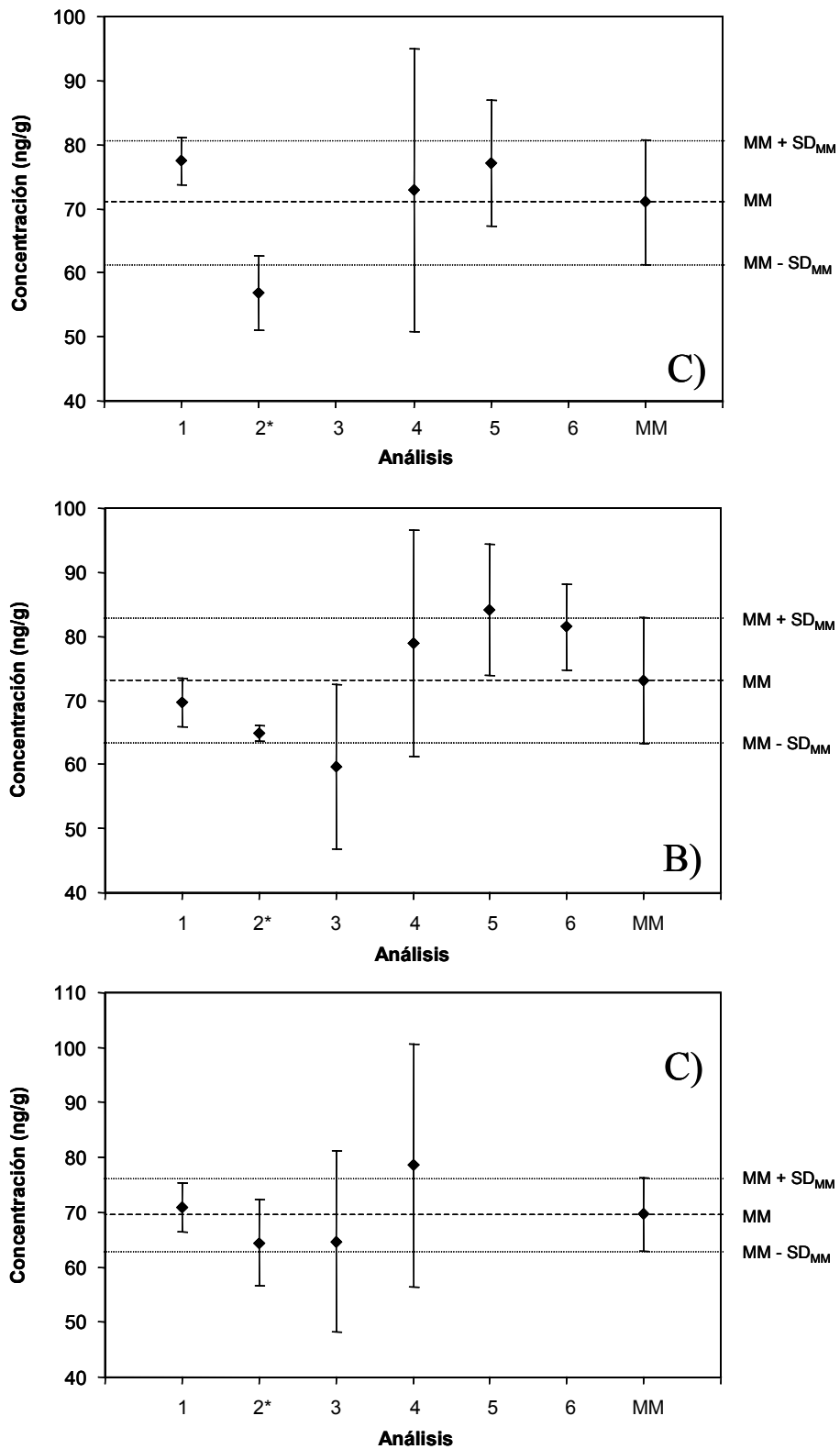


Figura 4.7.- Diagramas correspondientes a los resultados obtenidos por los laboratorios participantes para el análisis de A) 4,8-DiMeIQx, B) PhIP y C) MeAαC en el Lote B. MM: media de las medias. Las horquillas mostradas para cada valor corresponden al valor respectivo de desviación estándar. \* Resultado entregado por nuestro laboratorio.

## 4.2.2.4. Análisis del Lote C

Finalmente participamos en un último ejercicio de intercomparación en el cual se analizó el extracto de ternera liofilizado designado como Lote C, que contenía las mismas HAs que el Lote B pero a un nivel de concentración relativamente bajo ( $5\text{-}25\text{ ng g}^{-1}$ ). Nuestro objetivo en este análisis era el de validar nuestro método de un único extracto para analizar la mayoría de HAs a un nivel de concentración bajo. El análisis de la muestra se realizó de la misma manera que en los lotes A y B, utilizando el método tándem y el instrumento de trampa de iones (Apartado 3.2.2.4). Para la cuantificación de los analitos se empleó el método de la adición estándar. En la Figura 4.8 se muestra a modo de ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos en el análisis de la muestra.

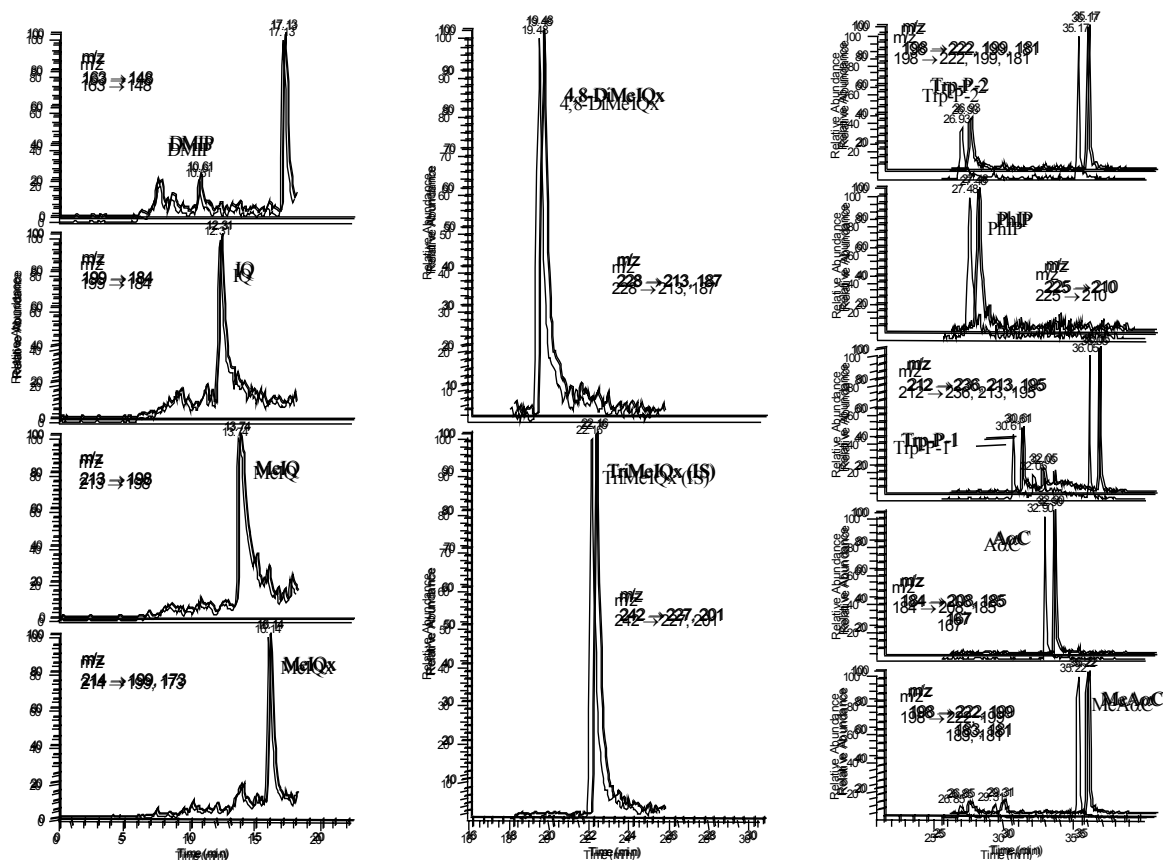


Figura 4.8.- Cromatogramas LC-MS/MS(IT) de los analitos a determinar en el Lote C y del patrón interno utilizado (TriMeIQx). Condiciones experimentales: elución por gradiente en fase invertida utilizando un tampón fórmico/formiato y acetonitrilo. Para mayor detalle, consultar Apartado 3.2.2.4.

Las cantidades de cada analito encontradas en el Lote C se indican en la Tabla 4.4, donde además se incluyen los valores promedio de las medias de todos los laboratorios participantes en el ejercicio. Como puede apreciarse, la concordancia entre las concentraciones calculadas por nuestro laboratorio y los valores promedio globales es elevada, y además, los valores de RSD fueron en la mayoría de los casos inferiores al 11%. En cuanto a la recuperación de los analitos, excepto para DMIP el valor obtenido fue superior al 55%. Así, las  $\gamma$ -carbolinas (Trp-P-1 y Trp-P-2) fueron recuperadas en un 55%, mientras que para las demás HAs la eficiencia fue del 65-75%.

Tabla 4.4.- Contenido ( $\text{ng g}^{-1}$ ) de las HAs a determinar en el Lote C.

Analitos	Nuestro laboratorio		Resultado global*	
	Concentración	RSD %	Media de las medias	RSD %
DMIP	7,0	17,2	11,0	37,5
IQ	8,3	9,1	9,8	44,5
MeIQ	10,1	11,1	10,4	10,9
MeIQx	8,4	7,7	8,8	17,4
4.8-DiMeIQx	8,5	5,2	8,8	30,0
Trp-P-2	9,0	8,8	9,2	12,4
PhIP	8,7	10,3	9,6	40,6
Trp-P-1	7,6	11,2	7,2	11,7
A $\alpha$ C	8,1	6,9	8,6	30,2
MeA $\alpha$ C	9,2	11,0	8,5	8,7

\* Obtenido a partir de todos los resultados proporcionados por los laboratorios participantes. n= 4 para MeIQ, MeIQx y MeA $\alpha$ C; n= 5 para DMIP, IQ, Trp-P-2 y A $\alpha$ C; n= 6 para 4,8-DiMeIQx y Trp-P-1; n= 7 para PhIP.

En las Figuras 4.9 y 4.10 se muestran los diagramas obtenidos en el análisis del Lote C tras eliminar los resultados descartados. El análisis 7 se llevó a cabo utilizando un método LC-ED. Todos los demás se realizaron utilizando métodos LC-MS. Entre ellos, el análisis 2 corresponde a los valores presentados por nuestro laboratorio, obtenidos utilizando el clean-up de un único extracto (Capítulo 2) y el método LC-MS/MS(IT) (Apartado 3.2.2.4). En el análisis 6 se ha utilizado también un tratamiento de muestra que proporciona un único extracto, pero a diferencia del nuestro utiliza un cartucho de SPE consistente en una fase polimérica mixta (intercambio catiónico + fase invertida). En todos los demás análisis el método de purificación aplicado ha consistido en el desarrollado por Gross (Gross *et al.*, 1992) y optimizado por Galceran (Galceran *et al.*, 1996), que proporciona dos extractos. Como puede observarse al comparar los resultados mostrados

en las Figuras 4.9 y 4.10, tanto la exactitud como la precisión proporcionadas por la metodología analítica utilizada por nuestra parte son elevadas, y en todo caso considerablemente mejores que las del análisis que utiliza otro *clean-up* de un extracto.

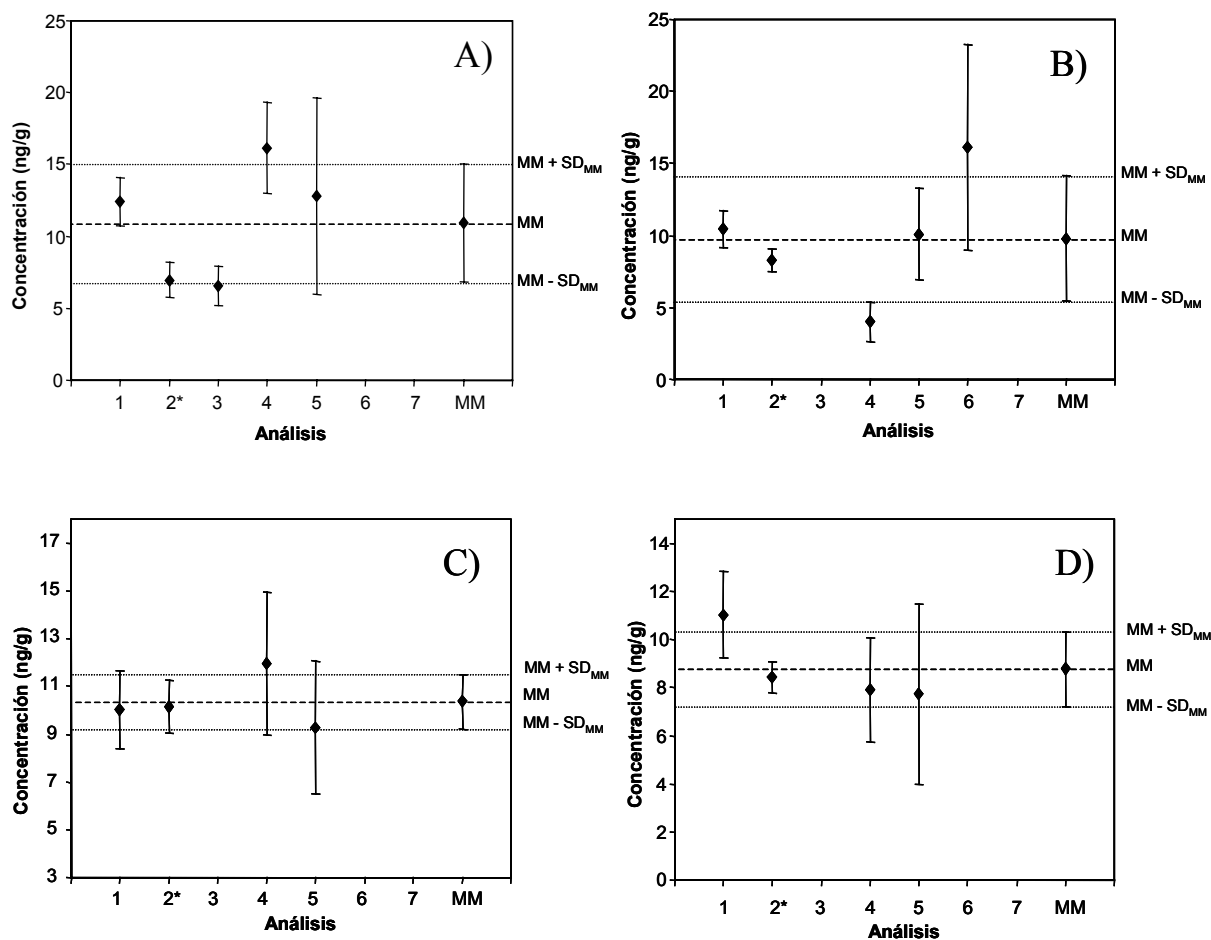


Figura 4.9.- Diagramas correspondientes a los resultados obtenidos por los laboratorios participantes para el análisis de A) DMIP, B) IQ, C) MeIQ y D) MeIQx en el Lote C. MM: media de las medias. Las horquillas mostradas para cada valor corresponden al valor respectivo de desviación estándar. \* Resultado entregado por nuestro laboratorio.

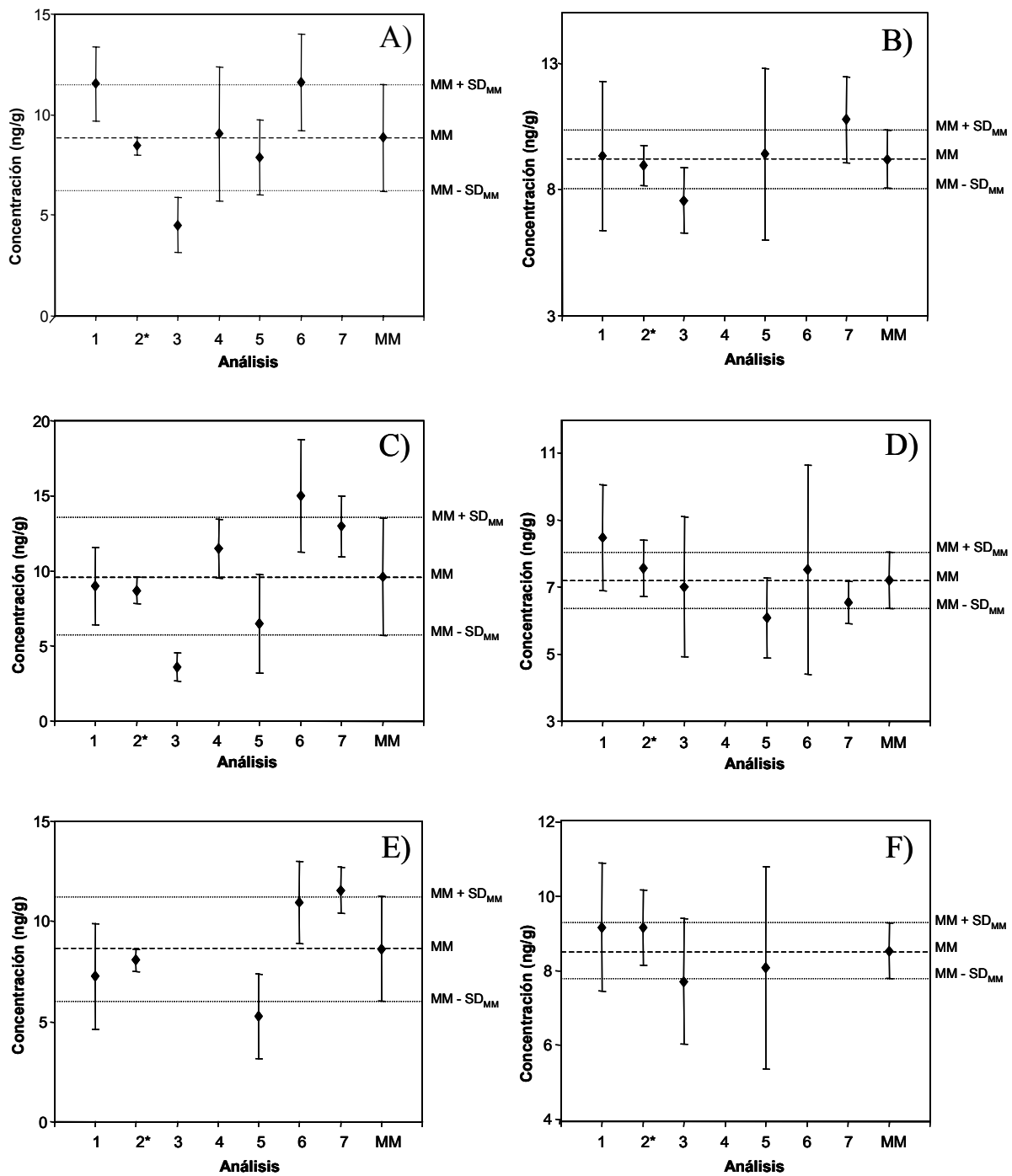


Figura 4.10.- Diagramas correspondientes a los resultados obtenidos por los laboratorios participantes para el análisis de A) 4,8-DiMeIQx, B) Trp-P-2, C) PhIP, D) Trp-P-1, E) AαC y F) MeAαC en el Lote C. MM: media de las medias. Las horquillas mostradas para cada valor corresponden al valor respectivo de desviación estándar. \* Resultado entregado por nuestro laboratorio.

### 4.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE TERNERA A LA PLANCHA

#### 4.3.1. Introducción y objetivos

Tras demostrar la validez de la metodología analítica desarrollada en esta memoria mediante la realización de diferentes ejercicios interlaboratorio, nos dispusimos a aplicarla para la determinación de HAs en muestras de ternera a la plancha. Este alimento y proceso de cocción se ha escogido debido a que es el alimento cárnico más consumido en el área de Barcelona, tal y como se dedujo de una encuesta realizada a 220 personas por nuestro grupo de investigación (Mitjans, 2002). En otra encuesta realizada a casi 500 personas en el área de Barcelona (Mitjans, 2002), también se dedujo que la ternera era una de las principales fuentes de carne ingerida (20 % del total de carne consumida), únicamente superada por el cerdo (25 % del total de carne consumida). Sin embargo, mientras que este segundo tipo de carne se consume rebozado y frito o bien a la plancha, la ternera se prepara mayormente a la plancha, por lo que este alimento resultó ser otra vez el más consumido en el área de aplicación de la encuesta. A nivel estatal, la información sobre frecuencia de consumo de alimentos ha sido recopilada por varias instituciones participantes en el proyecto EPIC (*European Prospective Investigation into Nutrition, Cancer and Health*) (Rohrmann *et al.* 2002). Según las encuestas realizadas a más de 3.200 personas de toda España, los productos cárnicos mayormente consumidos en el Estado son el pollo (740 g/día/persona) y la ternera (737 g/día/persona). En cuanto al modo de preparación, freír resultó ser el más popular, por lo que la mayor ingesta de alimentos cárnicos procesados correspondieron a la ternera frita (15,5 g/día/persona) y al pollo frito (6,5 g/día/persona). La ingesta de ternera a la plancha fue de 2,3 g/día/persona, lo que muestra que, aun siendo diferente el tipo de cocción preferido en Cataluña y en España, este alimento es también frecuentemente consumido a nivel estatal.

Con el fin de hacer una evaluación del contenido de HAs en ternera a la plancha, se preparó una muestra en condiciones controladas y se obtuvieron tres muestras de otros tantos restaurantes. El procedimiento de purificación y preconcentración aplicado consistió en el optimizado en el Capítulo 2 de esta memoria y que proporciona un único extracto conteniendo todas las HAs. Para asegurar el buen funcionamiento de este método de *clean-up* en el análisis de alimentos cocinados, en el caso de la muestra procesada en condiciones controladas se utilizó también el método de dos extractos propuesto por Gross (Gross *et al.*, 1992) y optimizado por Galceran (Galceran *et al.*, 1996), que es el más frecuentemente

utilizado en la bibliografía para este tipo de análisis. La cuantificación se realizó utilizando el método de adición estándar, además del de dilución isotópica cuando fue posible. Los análisis se llevaron a cabo mediante la metodología analítica LC-MS/MS(IT) desarrollada en la memoria (apartado 3.2.2.4). El trabajo experimental realizado se engloba en el Artículo VIII incluido en el presente Capítulo. Dicho artículo, el cual lleva por título "*Heterocyclic amines in griddled beef steak using a single extract clean-up procedure*", ha sido recientemente enviado para su publicación en la revista *Food and Chemical Toxicology*.

### 4.3.2. Trabajo experimental

#### **Artículo VIII**

*Heterocyclic amines in griddled beef steak using a single extract clean-up procedure*

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

Enviado para su publicación en: Food and Chemical Toxicology (2003)



## 4.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.4.1. Precisión de los métodos LC-UV y LC-MS

Como se presentó en los Capítulos 2 y 3 de esta memoria, la precisión de todos los métodos desarrollados fue evaluada mediante inyecciones repetidas de una disolución estándar, dentro de un mismo día (repetitividad) o en diferentes (precisión a medio plazo). Mientras que la variabilidad obtenida a corto y medio plazo para los métodos LC-UV (Apartados 2.2.2.1 y 3.2.2.1) y LC-MS con el instrumento de triple cuadrupolo (Apartado 3.3.2.1) fue similar, para los métodos desarrollados utilizando el instrumento de trampa de iones se observó un ligero aumento de la RSD % al analizar la disolución en diferentes días. Sin embargo, no se puede afirmar que la precisión proporcionada por los diferentes métodos en el análisis de patrones sea diferente, ya que en la mayoría de los casos el valor de RSD ha oscilado entre 3% y 10%.

El cálculo de la precisión proporcionada por los métodos se ha evaluado también en el presente capítulo mediante la participación en los ejercicios de intercomparación organizados por nuestro laboratorio. En primer lugar, se realizó el análisis de una disolución de referencia, tal y como se describe en el Apartado 4.2.2.1. Las RSD obtenidas, mostradas en la Tabla 4.1, fueron generalmente inferiores al 5% y en ningún caso superó el 11%. Como era de esperar, estos valores son similares a los obtenidos con disoluciones patrón, ya que en ambos casos la variación de la respuesta únicamente depende de cambios en el sistema de análisis.

En el caso del análisis de los Lotes A, B y C (Apartados 4.2.2.2, 4.2.2.3 y 4.2.2.4), la precisión obtenida ha sido peor a la correspondiente a disoluciones, ya que en este caso la precisión depende, además de la variabilidad instrumental, de variaciones en la recuperación de los analitos tras el tratamiento de muestra y de posibles efectos de la matriz en la respuesta. A modo de ejemplo, la Figura 4.11 muestra los valores de RSD % obtenidos para IQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP y A $\alpha$ C en el análisis de la disolución de referencia y de los diferentes extractos de carne. Como puede observarse en esta figura, otro factor importante en el aumento de la variabilidad es el nivel de concentración del compuesto, ya que si está cercano al límite de cuantificación la variabilidad aumenta considerablemente. Así, la baja selectividad del sistema de detección UV provoca que el límite de detección de la PhIP sea elevado, por lo que se origina una RSD superior al 30%.

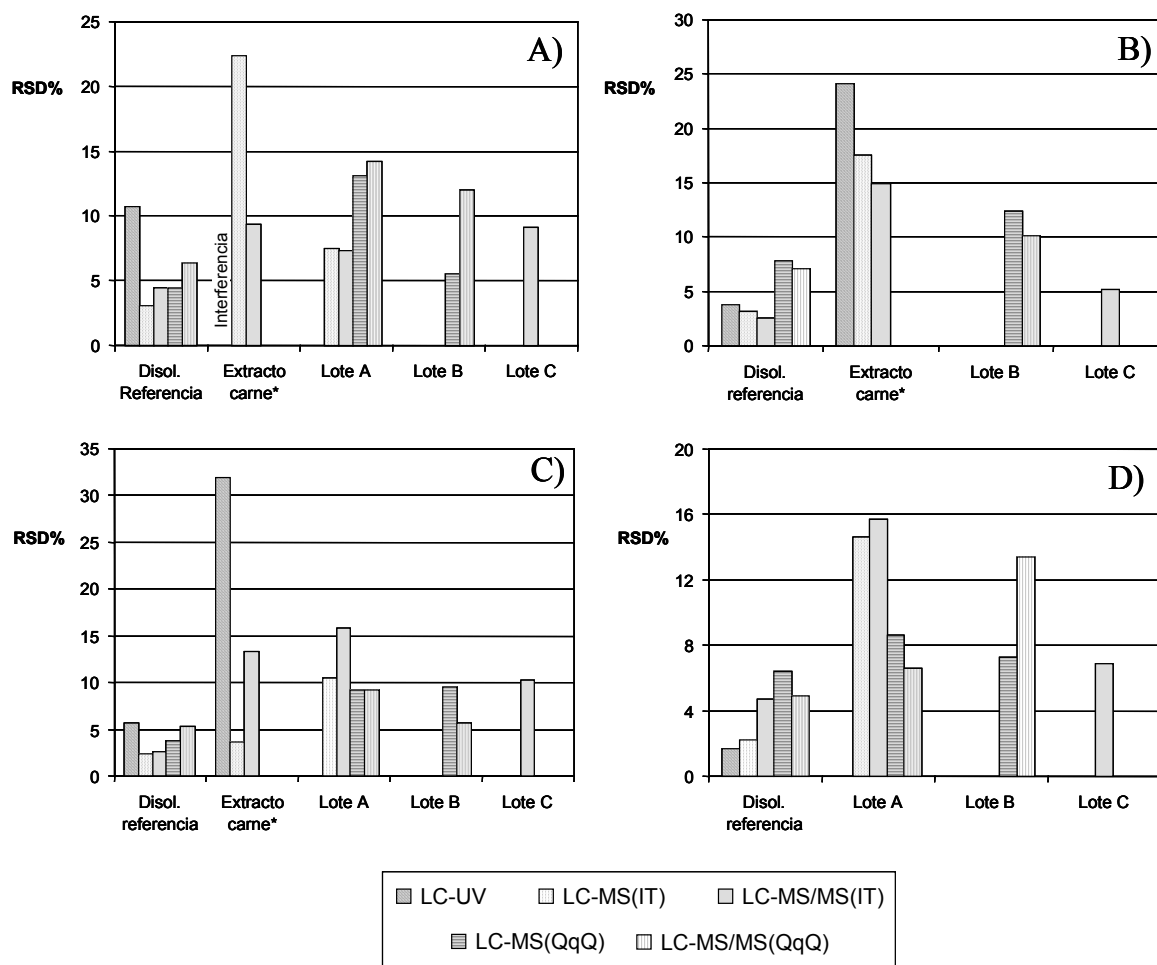


Figura 4.11.- Variabilidad obtenida en la cuantificación de A) IQ, B) 4,8-DiMeIQx, C) PhIP y D) A $\alpha$ C al analizar diferentes muestras utilizando los sistemas LC-UV y LC-MS desarrollados en esta memoria. \* Extracto de carne liofilizado cuya preparación se describe en la Tesis Doctoral de P.Pais (Pais, 1996).

#### 4.4.2. Exactitud de los métodos LC-UV y LC-MS

La exactitud proporcionada por los métodos de análisis desarrollados en los Capítulos 2 y 3 de la memoria ha sido evaluada en los respectivos apartados mediante la cuantificación de las HAS en disoluciones patrón. En la mayoría de los casos, las diferencias relativas porcentuales entre el valor medio calculado y el teórico no han superado el 5%, y sólo se han obtenido diferencias ligeramente por encima del 10% para la determinación de norharman mediante LC-UV con el tampón de ácido fórmico y para MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx y 4,8-DiMeIQx analizados con el sistema LC-MS(QqQ).

También se ha podido estimar la exactitud proporcionada por los métodos LC-UV y LC-MS mediante el análisis de la disolución de referencia, descrito en el Apartado 4.2.2.1.

Las diferencias porcentuales relativas obtenidas en este caso se muestran en la Figura 4.12, donde puede observarse que sólo se ha superado el 10% de diferencia para la determinación de MeIQx mediante LC-MS(QqQ) y quinolinas y  $\alpha$ -carbolinas mediante LC-UV. En el caso de MeIQx, la peor exactitud es debida a la existencia de la interferencia comentada en el Apartado 3.4.1, mientras que en el caso de la detección por UV el error puede estar introducido por deformaciones en la línea de base originadas por la elución por gradiente y por la peor selectividad del sistema de detección.

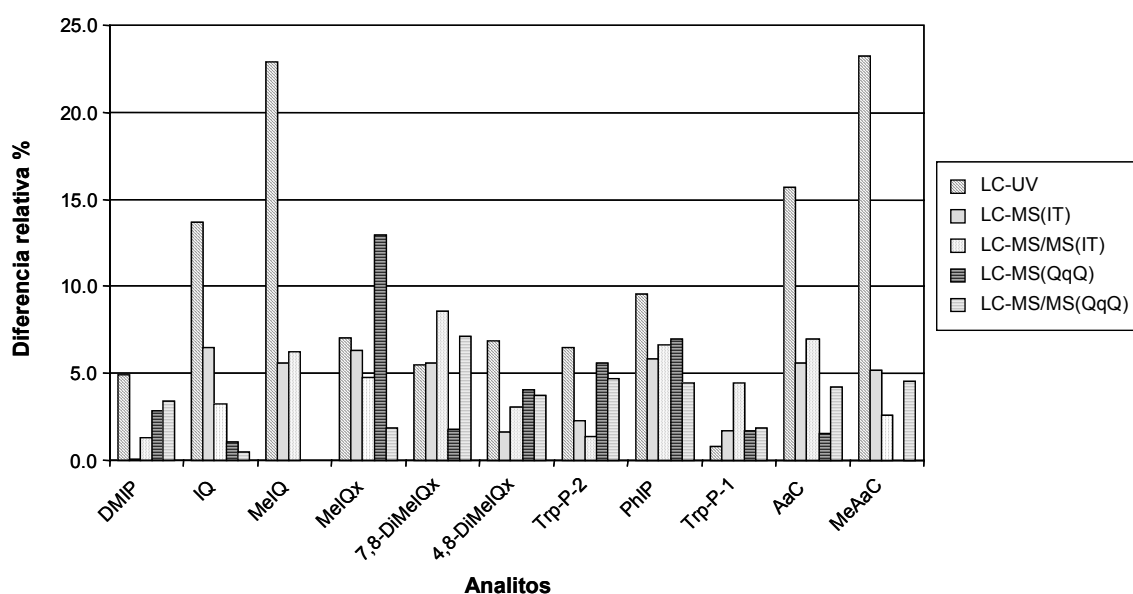


Figura 4.12.- Valores de exactitud, medidos como diferencias relativas porcentuales, obtenidos en el análisis de una disolución de referencia utilizando diferentes métodos LC-UV y LC-MS desarrollados en la memoria.

En el caso de los extractos de carne analizados (Lotes A, B y C), únicamente ha sido posible estimar la exactitud proporcionada por los diferentes métodos de análisis mediante la comparación de las concentraciones obtenidas con la media global calculada a partir de todos los valores presentados en el ejercicio interlaboratorio correspondiente. Las exactitudes calculadas de esta manera, incluidas en la Tabla 4.8, muestran que las diferencias relativas porcentuales raramente superan el 20%. En el caso de DMIP analizada en el Lote C, la diferencia es algo superior al 35% debido al bajo nivel de concentración del analito ( $\sim 10 \text{ ng g}^{-1}$ ) y a su baja recuperación ( $\sim 40\%$ ), lo que introduce una considerable incertidumbre en la cuantificación de esta HA. Por un motivo similar, la determinación de Trp-P-1 y Trp-P-2 en el Lote B también fue poco exacta (diferencias relativas porcentuales

>50%), sobretodo al utilizar el método LC-MS(QqQ). Sin embargo, la sustitución del intercambiador catiónico del método de tratamiento de muestra consiguió mejorar la recuperación de estos analitos, de manera que en su cuantificación en el Lote C la diferencia porcentual relativa fue inferior al 6%.

Tabla 4.8.- Estimación de la exactitud proporcionada por los métodos LC-MS. Los valores se han obtenido calculando la diferencia porcentual normalizada con respecto al promedio global obtenido en el respectivo ejercicio interlaboratorio.

Analitos	Diferencias relativas porcentuales							
	LC-MS(IT)		LC-MS/MS(IT)		LC-MS(QqQ)		LC-MS/MS(QqQ)	
	Lote A	Lote A	Lote C	Lote A	Lote B	Lote A	Lote B	
DMIP	-	-	36	-	3,4	-	8,4	
IQ	17	28	15	17	3,3	8,8	10	
MeIQ	2,4	19	2,9	19	7,5	5,8	3,8	
MeIQx	0,9	4,6	4,5	8,1	0,2	20	29	
4,8-DiMeIQx	-	-	3,4	-	24	-	21	
Trp-P-2	-	-	2,2	-	64	-	54	
PhIP	6,7	10	9,4	3,2	12	1,7	15	
Trp-P-1	-	-	5,6	-	72	-	59	
A $\alpha$ C	2,8	10	5,8	22	16	61	4,6	
MeA $\alpha$ C	-	-	8,2	-	5,2	-	9,0	

#### 4.4.3. Adición estándar vs. dilución isotópica

La disponibilidad de IQ, MeIQx y PhIP trideuteradas ha permitido cuantificar los respectivos analitos nativos utilizando el método de dilución isotópica. Dicho método consiste en la adición, previamente al tratamiento de muestra, de una cantidad conocida del analito marcado isotópicamente. La cuantificación puede entonces realizarse utilizando el compuesto trideuterado como patrón interno. Este método de cuantificación no sólo permite compensar la variabilidad introducida por la recuperación del analito, sino que también minimiza cambios originados por el sistema de determinación. Por otro lado, la posibilidad de sustituir la cuantificación mediante adición estándar por una cuantificación utilizando una recta de calibrado externa con las HAs marcadas como patrón interno permite reducir el número de muestras a analizar. En este capítulo, la mejora introducida por el uso de la dilución isotópica se ha evaluado comparando los resultados proporcionados por este método de cuantificación con los obtenidos utilizando la adición estándar. Las muestras analizadas han sido el Lote A, el Lote B y la muestra de ternera a la

plancha cocinada en condiciones controladas (Muestra A del artículo incluido en el apartado 4.3.2 de la memoria). El tratamiento de muestra aplicado ha sido el que proporciona un único extracto y que fue establecido en el Capítulo 2 de la memoria; el análisis se ha llevado a cabo con los diferentes sistemas LC-MS desarrollados en el Capítulo 3.

En la Tabla 4.9 se compara la precisión proporcionada por los dos métodos de cuantificación en los Lotes A y B, al utilizar diferentes métodos de análisis LC-MS. Como puede observarse, los valores de RSD % obtenidos empleando dilución isotópica son en todos los casos inferiores a los obtenidos mediante adición estándar. Aunque teóricamente la exactitud también mejora al utilizar el método de la dilución isotópica, el no disponer de un material de referencia certificado no ha hecho posible la comparación de este parámetro utilizando los dos métodos de cuantificación.

Tabla 4.9.- Valores de desviación estándar relativa (RSD %) obtenidas con el método de adición estándar y con el de dilución isotópica en el análisis de los Lotes A y B.

Muestra	Método de análisis	Método de cuantif.	RSD %		
			IQ	MeIQx	PhIP
Lote A	LC-MS(IT)	Ad.std.	8	11	11
		Dil.isot.	3	3	3
	LC-MS/MS(IT)	Ad.std.	7	14	16
		Dil.isot.	7	10	5
	LC-MS(QqQ)	Ad.std.	13	42	9
		Dil.isot.	5	29	2
	LC-MS/MS(QqQ)	Ad.std.	14	14	9
		Dil.isot.	3	4	8
Lote B	LC-MS(QqQ)	Ad.std.	6	40	10
		Dil.isot.	4	20	9
	LC-MS/MS(QqQ)	Ad.std.	12	12	6
		Dil.isot.	3	2	2

En la Figura 4.13 se comparan también los resultados obtenidos al emplear los dos métodos de cuantificación, pero esta vez en la determinación de HAs en las muestras de ternera a la plancha cuyo análisis se describe en el apartado 4.3.2. Como puede observarse en la figura, aunque las concentraciones de MeIQx y PhIP son equivalentes con los dos métodos de cuantificación, la precisión alcanzada con la dilución isotópica es mayor que con la adición estándar en todos los casos.

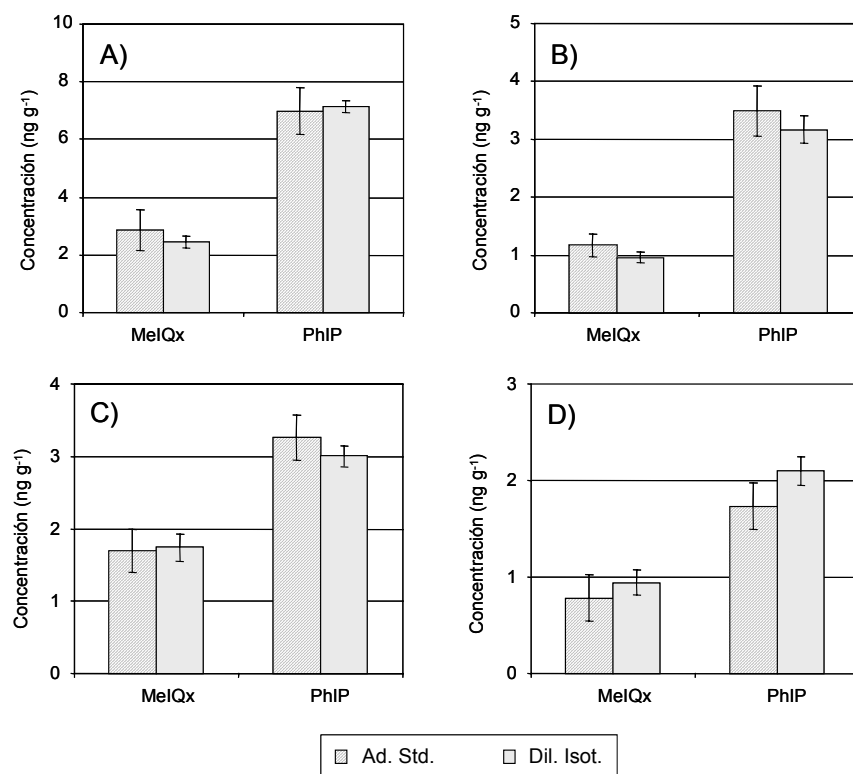


Figura 4.13.- Comparación de las concentraciones de MeIQx y PhIP obtenidas mediante adición estándar y dilución isotópica en varias muestras de ternera a la plancha cuyo análisis se describe en el apartado 4.3.2. A) Muestra A; B) Muestra B; C) Muestra C; D) Muestra D. Las horquillas corresponden a los respectivos valores de desviación estándar.

#### 4.4.4. Validación de la metodología de tratamiento de muestra

El método desarrollado en el Capítulo 2 de la memoria, el cual conseguía obtener un único extracto mediante el uso de ácido propilsulfónico enlazado a sílice como adsorbente de intercambio catiónico, ha sido validado mediante la participación en los ejercicios interlaboratorios que tenían como objetivo el análisis de los Lotes A, B y C. Mientras que la mayoría de participantes utilizó el método recomendado, que era el de 2 extractos, nosotros aplicamos un método propio, que fue el de 1 extracto. Tal y como se comentó en los apartados 4.2.2.2, 4.2.2.3 y 4.2.2.4 y a lo largo de la discusión de resultados, la equivalencia de los resultados aportados por nuestro laboratorio y los promedios globales calculados en cada ejercicio interlaboratorio demuestra la validez del tratamiento de muestra aplicado en nuestro caso.

El buen funcionamiento del método de tratamiento de muestra desarrollado en la memoria ha sido también comprobado comparando los resultados obtenidos en su aplicación con los correspondientes al método de dos extractos (Galceran *et al.*, 1996). En primer lugar, se han aplicado los dos métodos de tratamiento de muestra para extraer y purificar las HAs presentes en un extracto de ternera liofilizado cuya preparación se describió en la Tesis Doctoral de P.Pais (Pais, 1996). El análisis mediante LC-MS/MS(IT), descrito en el Apartado 3.2.2.4 del Capítulo 3, proporcionó los resultados que se muestran en la Figura 4.14. Como se puede observar, la concentración de los analitos calculada utilizando los dos métodos de tratamiento de muestra están perfectamente de acuerdo.

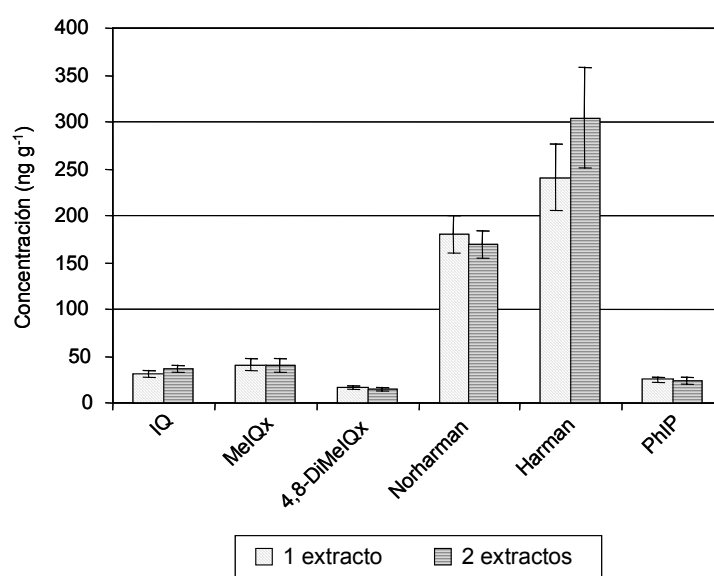


Figura 4.14.- Comparación de los resultados obtenidos al aplicar los métodos de tratamiento de muestra de 1 y 2 extractos para calcular el contenido de HAs en un extracto de carne liofilizado. El análisis se ha llevado a cabo mediante LC-MS/MS(IT) tal y como se describe en el Apartado 3.2.2.4.

La aplicabilidad del método de un único extracto también se ha demostrado analizando el contenido de HAs en una muestra de ternera a la plancha. En este caso, la determinación se realizó utilizando el método LC-MS/MS(IT), tal y como se describe en el apartado 4.3.2 del presente capítulo. Los resultados obtenidos, mostrados en la Tabla 4.10, indican que la concentración de los analitos es equivalente con independencia del tratamiento de muestra aplicado.

Tabla 4.10.- Nivel de concentración de las HAs encontradas en una muestra de ternera a la plancha al aplicar los métodos de tratamiento de muestra de 1 y 2 extractos.

Analitos	Método de 1 extracto		Método de 2 extractos	
	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD%	Conc. (ng g <sup>-1</sup> )	RSD%
MeIQx	2,86	24	2,65	19
MeIQx*	2,44	9	2,06	8
4,8-DiMeIQx	1,27	22	1,16	17
Norharman	21,2	15	28,9	20
Harman	5,9	20	5,3	23
PhIP	6,99	12	5,18	10
PhIP*	7,12	3	6,25	7
Trp-P-1	0,35	71	0,45	76
A $\alpha$ C	0,33	76	76	28
MeA $\alpha$ C	0,15	80	80	71

\* Cuantificado por dilución isotópica.

#### 4.4.5. Análisis de HAs en muestras de ternera a la plancha

Una vez demostrados los buenos resultados proporcionados por la metodología analítica desarrollada en la memoria, se determinó el contenido de las aminos mutágenas estudiadas en diferentes muestras de ternera a la plancha, una de ellas cocinada en condiciones controladas (muestra A) y otras tres obtenidas de fuentes comerciales (muestras B, C y D). Así, el tratamiento de muestra aplicado consistió en el de un único extracto desarrollado en el Capítulo 2 de la memoria, mientras que el método de análisis fue el método de espectrometría de masas en tándem utilizando un instrumento de trampa de iones (Apartado 3.2.2.4). Tal y como se discute en el artículo VIII incluido en el Apartado 4.3.2, los bajos límites de detección alcanzados y la elevada precisión proporcionada por la metodología analítica empleada permitieron cuantificar con un elevado grado de fiabilidad los analitos presentes en la muestra a niveles de concentración de hasta 0,2 ng g<sup>-1</sup>, como se muestra en la Figura 4.15.

Así, el compuesto encontrado en mayor cantidad en las cuatro muestras fue el comutágeno norharman (2,42-21,2 ng g<sup>-1</sup>), seguido de harman (1,2-5,9 ng g<sup>-1</sup>) y PhIP (7,12-2,1 ng g<sup>-1</sup>). También se cuantificaron en todas las muestras la MeIQx (0,94-2,44 ng g<sup>-1</sup>) y la 4,8-DiMeIQx (0,28-1,27 ng g<sup>-1</sup>). Los analitos presentes en las muestras en menor concentración fueron Trp-P-1, que sólo se detectó en las muestras A y B a ~0,35 ng g<sup>-1</sup>, A $\alpha$ C, detectada en las muestras A, B y D (0,18-1,41 ng g<sup>-1</sup>) y MeA $\alpha$ C, detectada en las muestras A, B y D pero cuantificada únicamente en la A (~0,15 ng g<sup>-1</sup>). Al igual que

MeA $\alpha$ C en las muestras B y D, hubo otras HAs que también se detectaron a un nivel inferior a su límite de cuantificación, por lo que no se pudo determinar su concentración en la muestra. Estos analitos detectados a un nivel cercano a su límite de detección fueron DMIP en las muestras A, B y D y Trp-P-2 en las muestras A, B y C.

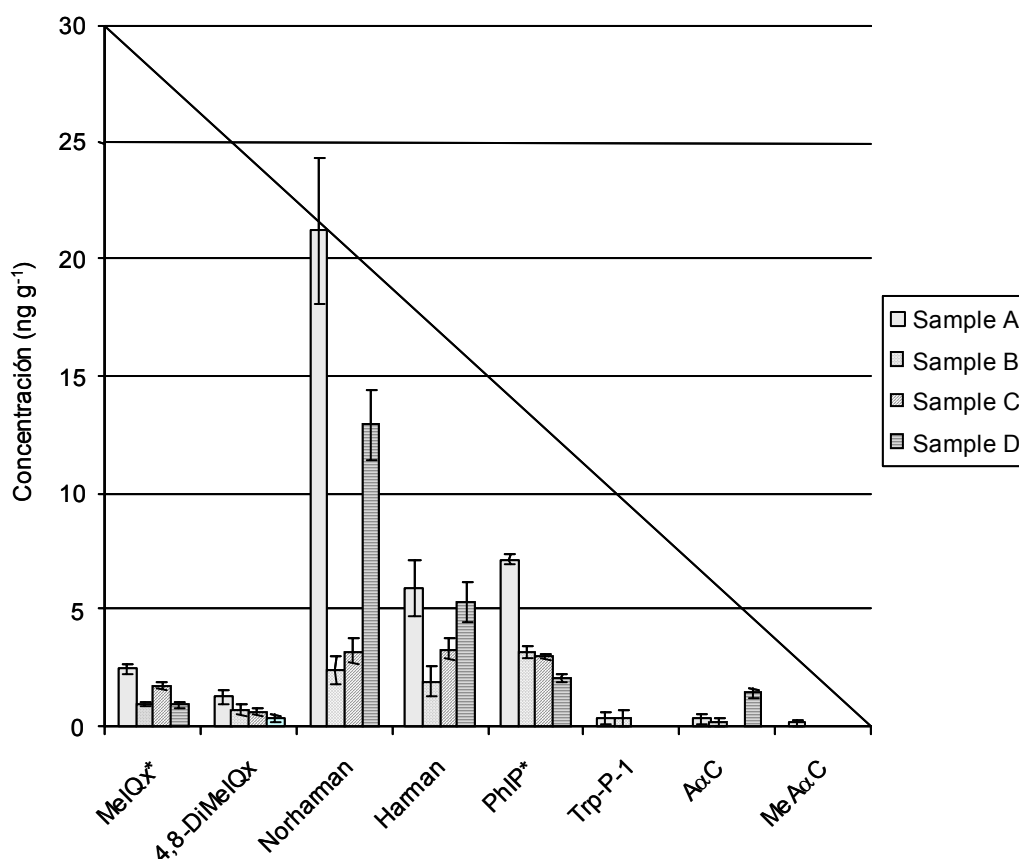


Figura 4.15.- Cuantificación de las HAs encontradas en diferentes muestras de ternera a la plancha. \*Los niveles de concentración mostrados para MeIQx y PhIP han sido calculados mediante dilución isotópica.

Si comparamos los datos obtenidos en este trabajo con las concentraciones de HAs descritas en la bibliografía para muestras de ternera cocinada (Tabla 4.11), podremos observar que nuestros resultados están de acuerdo con los de otros grupos de investigación. En la Tabla 4.11 puede observarse que la cantidad de quinolinas detectada en muestras de ternera es pequeña, mientras que las de PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx son mayores en este orden de importancia (Wakabayashi *et al.*, 1993; Knize *et al.*, 1994; Felton *et al.*, 1994; Zimmerli *et al.*, 2001; Heddle *et al.*, 2001). A pesar de las numerosas publicaciones relacionadas con el análisis de HAs en alimentos, en la mayoría de los casos se determina un reducido número de analitos, sobretodo quinolinas, quinoxalinas y PhIP. Sin embargo,

tal y como se ha demostrado en nuestro trabajo, las carbolinas también se forman en las muestras de carne cocinada, algunas veces en cantidades elevadas. Por este motivo, es recomendable la inclusión en los análisis del mayor número posible de HAs a fin de poder calcular más ajustadamente a la realidad los valores de ingesta.

Tabla 4.11.- Datos bibliográficos de la concentración de diferentes HAs en muestras de ternera cocinada y resultados obtenidos en la memoria.

Contenidos en ternera cocinada (ng/g)									Referencia
IQ	MeIQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	PhIP	H	Glu-P-1	Trp-P-1	AαC	
50									(Barnes <i>et al.</i> , 1983)
0,3-1,9		2,7-12,3	0-3,9						(Turesky <i>et al.</i> , 1988)
n.d.		1,1	n.d.	1,2					(Gross <i>et al.</i> , 1989)
		5,1-8,3	1,3-2	23,5-48,5				3,2-8,9	(Gross, 1990)
		n.d.-2,0	n.d.	n.d.-3,1				n.d.	(Gross <i>et al.</i> , 1993)
		2,2	0,7	16,4					(Murray <i>et al.</i> , 1993)
n.d.-0,19	n.d.	0,64-2,11	n.d.-0,12	0,56-15,7			0,19-0,21	n.d.-1,20	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
n.d.-1,0		3,0-5,1	0,3-1,2	2,7-13,3					(Felton <i>et al.</i> , 1994)
		16,4	4,5	1,47				21,0	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1994)
n.d.-0,7		n.d.-7,3	n.d.-1,6	n.d.-9,8					(Knize <i>et al.</i> , 1994)
		1,1-1,6	0,2-0,4	0,9-1,5					(Johansson <i>et al.</i> , 1995)
		n.d.-0,3	n.d.-0,1	0,1-0,6					(Knize <i>et al.</i> , 1995)
		n.d.-6,2	n.d.-2,7	0,01-12,7					(Skog <i>et al.</i> , 1995)
		4,3-16	1,3-4,5	4,9-68				n.d.-21	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1995)
		6	1,2	14					(Fay <i>et al.</i> , 1997)
		0,5		30				55	(Knize <i>et al.</i> , 1997b)
		0,89-16,4	n.d.-4,5	11-67,5					(Knize <i>et al.</i> , 1997a)
		n.d.-1,97		n.d.-1,89	0-2,25				(Abdulkarim <i>et al.</i> , 1998)
n.d.-0,51	n.d.-1,21	n.d.-0,91	n.d.-0,78	n.d.-2,81	n.d.-2,84	n.d.	n.d.-1,03	n.d.-0,23	(Chiu <i>et al.</i> , 1998)
		0,2-2,4	n.d.-0,4	1,8-18,4					(Knize <i>et al.</i> , 1998)
2,0-12,5		5,0-8,7	1,8-4,1						(Mardones <i>et al.</i> , 1998)
		0,4	n.d.	0,3					(Richling <i>et al.</i> , 1998)
		n.d.-8,2		n.d.-30,0					(Sinha <i>et al.</i> , 1998)
		n.d.-3,80	0,06-0,80	0,029-7,33					(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
		1,43	0,2	1,2					(Pais <i>et al.</i> , 1999)
		0,4	n.d.						(Richling <i>et al.</i> , 1999)
					3,63-7,0				(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
0,7-5,3	0,1-3,5	0,5-5,8	0,8-4,8	0,9-31,4					(Balogh <i>et al.</i> , 2000)
n.d.	n.d.	2,3-17,3	n.d.-2,2	0,9-28,5					(Hedde <i>et al.</i> , 2001)
		3,36		17,8					(Murray <i>et al.</i> , 2001)
n.d.	n.d.	0,7-1,3	n.d.	n.d.-4,3	1,5				(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
n.d.	n.d.	2,4-2,9	1,3	6,9-7,2	5,9	n.d.	0,4	0,3	Muestra A (esta memoria)
n.d.	n.d.	0,9-1,2	0,7	3,1-3,5	1,9	n.d.	0,4	0,2	Muestra B (esta memoria)
n.d.	n.d.	1,7-1,8	0,7	3,0-3,3	3,3	n.d.	n.d.	n.d.	Muestra C (esta memoria)
n.d.	n.d.	0,8-0,9	0,3	1,7-2,1	5,3	n.d.	n.d.	1,4	Muestra D (esta memoria)

## 4.5. CONCLUSIONES

El trabajo experimental incluido en el Capítulo 4 de la memoria nos ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

- La metodología analítica desarrollada en la presente Tesis Doctoral ha demostrado su validez mediante la participación en ejercicios interlaboratorio.
  - El análisis de una disolución de referencia que contenía las HAs a un nivel de  $\sim 1,4 \mu\text{g g}^{-1}$  ha puesto de manifiesto que las RSD en el análisis de disoluciones metanólicas a este nivel de concentración son en todo caso inferiores al 11%. Además, la utilización de la espectrometría de masas como sistema de detección ha hecho posible que las diferencias relativas con respecto al valor teórico de concentración sólo hayan superado el 10% en la determinación de MeIQx por LC-MS(QqQ). Excepto en este caso, en el que existe una especie interferente, se ha demostrado que los valores calculado y teórico de concentración son equivalentes mediante un análisis de la varianza.
  - Aunque la variabilidad producida en el análisis de los extractos de carne preparados por nuestro laboratorio (Lotes A, B y C) ha sido superior a la obtenida en el análisis de la solución de referencia, únicamente se ha superado el 12% de RSD para los casos en los que los valores de recuperación son pequeños o en el caso de MeIQx analizada por LC-MS(QqQ). Por otro lado, la comparación de los valores de concentración calculados para cada muestra con la media de las medias obtenida en el respectivo ejercicio interlaboratorio ha puesto de manifiesto que las diferencias relativas raramente superan el 20%.
  - La cuantificación mediante dilución isotópica ha proporcionado resultados de una mayor precisión que los obtenidos utilizando el método de adición estándar. Sin embargo, la exactitud no se ha podido evaluar por no disponer de un material de referencia certificado, y además la aplicación de este método de cuantificación únicamente es posible en el caso de los analitos de los cuales se dispone de la correspondiente molécula marcada isotópicamente.
- La validez del método de tratamiento de muestra de un único extracto ha sido demostrada mediante, además de la participación en ejercicios interlaboratorio, la comparación con el método de dos extractos (Gross *et al.*, 1992; Galceran *et al.*, 1996)

normalmente utilizado. Tanto en el análisis de un extracto de carne como en el de una muestra de ternera a la plancha, las concentraciones obtenidas al aplicar los dos métodos ha sido equivalente.

- Por un lado los bajos límites de detección y por otro el elevado grado de precisión alcanzados con la metodología de análisis establecida en la memoria ha permitido determinar con un elevado grado de fiabilidad el contenido de HAs en diferentes muestras de ternera a la plancha.
  - La concentración de los analitos en las diferentes muestras analizadas ha oscilado entre  $0,2 \text{ ng g}^{-1}$  y  $21 \text{ ng g}^{-1}$ . Las HAs presentes en mayor cantidad han sido los comutágenos harman y norharman, seguidos de los aminoimidazoazaarenes PhIP, MeIQx y 4,8-DiMeIQx y de las carbolinas A $\alpha$ C, Trp-P-1 y MeA $\alpha$ C.
  - Las concentraciones obtenidas en las muestras analizadas conjuntamente con los datos proporcionados por el proyecto EPIC han hecho posible estimar la exposición a las HAs derivadas del consumo de ternera a la plancha. Así, los analitos ingeridos en mayor cantidad son la Norharman ( $22,9 \text{ ng/día/persona}$ ), la Harman ( $9,4 \text{ ng/día/persona}$ ), la PhIP ( $8,9 \text{ ng/día/persona}$ ) y la MeIQx ( $3,5 \text{ ng/día/persona}$ ). Teniendo en cuenta todas las HAs cuantificadas en las muestras, la ingesta total diaria derivada del consumo de ternera a la plancha es de  $49,0 \text{ ng/persona}$ .
  - Aunque en la mayoría de trabajos publicados en la bibliografía únicamente se determina el contenido de algunos AIAs, la presencia de una gran variedad de analitos en las muestras analizadas en este trabajo hace recomendable el uso de metodología analítica que permita determinar no solamente AIAs sino también carbolinas.

## HETEROCYCLIC AMINES IN GRIDDLED BEEF STEAK USING A SINGLE EXTRACT CLEAN-UP PROCEDURE

F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou\* and M.T. Galceran  
Analytical Chemistry Department. University of Barcelona.  
Martí i Franquès, 1-11. E-08028, Barcelona, Spain.

\* Author to whom correspondence should be addressed

Phone : +34 93 402 12 32

Fax: +34 93 402 12 33

e-mail: puignou@apolo.qui.ub.es

**Keywords:** Heterocyclic amines, intake, cooked meat, griddled beef steak.

### ABSTRACT

Heterocyclic amines (HAs), potent mutagenic and carcinogenic substances, are formed in muscle meats during their cooking under ordinary conditions. In this work, we measured the concentration of fifteen HAs in different griddled beef steak samples, which is one of the most consumed meat items in Spain. Three samples were obtained from different restaurants, whereas the other one was cooked under controlled conditions to a well done level. A single extract tandem solid-phase extraction procedure was used to purify the sample, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry with an ion trap mass analyser was used as determination technique. MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP and the comutagens harman and norharman were found in all the samples, at levels ranging from 0.28 to 21.2 ng g<sup>-1</sup>. AαC was found in three samples (0.18-1.41 ng g<sup>-1</sup>), whereas Trp-P-1 was detected in two samples (0.35 ng g<sup>-1</sup>) and MeAαC in three, but could only be quantified in one (0.15 ng g<sup>-1</sup>). Trp-P-2 and DMIP were also detected in some cases at levels below their limit of quantification. The rest of HAs analysed were not detected in any of the samples.

### INTRODUCTION

Human population is exposed to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines (HAs) through diet. These microcontaminants are produced in muscle meats when they are thermally processed under normal conditions (Knize *et al.*, 1999; Skog *et al.*, 1998). To date, more than 20 compounds included in this family have been isolated and characterised from different cooked food samples and several model systems (Borgen *et al.*, 2001; Felton *et al.*, 1984). Their formation is greatly influenced by several factors, being cooking temperature, duration and method some of the most critical parameters (Chiu *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 1998). Depending on their structure and formation, HAs can be classified into two main groups called carbolines and aminoimidazoazaarenes (AIAs). Chemical modelling has shown that carbolines are generated from the pyrolysis of aminoacids via free radical reaction, at temperatures generally above 250°C (Skog *et al.*, 2000). On the other hand, AIAs are more easily formed during ordinary cooking due to the

reaction between creati(ni)ne, sugars and free aminoacids, with the Maillard reaction playing an important role (Arvidsson *et al.*, 1997; Skog, 1993).

Most heterocyclic amines are potent mutagens after metabolic activation when tested both *in vivo* and *in vitro* (Felton *et al.*, 1995; Hatch, 1986; Schut and Snyderwine, 1999). Only Harman and Norharman are not directly mutagenic, but their presence enhance the genotoxicity of the other HAs (Wakabayashi *et al.*, 1997). Moreover, the 10 HAs bioassayed to date with long-term animal studies have been shown to be carcinogenic in rats, mice or even monkeys (Imaida *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 1999). From this evidences, the International Agency for Research on Cancer (IARC) considers some of the HAs so far tested as possible human carcinogens (Group 2 B: MeIQ, MeIQx, PhIP, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2) and one as probably human carcinogen (Group 2A: IQ) (IARC, 1987; IARC, 1993).

To better assess the contribution of HAs in human cancer etiology, their intake needs to be accurately determined. To this end, the concentration of these mutagens in the most commonly consumed meat/fish items cooked by various techniques must be established (Keating *et al.*, 1999). As shown by food frequency questionnaires, griddle beef steak is the most consumed meat dish in the area of Barcelona, and one of the most popular diets in Spain (Mitjans, 2002). Therefore, the aim of this work was to determine the amount of fifteen heterocyclic amines in different griddled beef steak samples, obtained from different in-house and commercial sources. The extraction and purification of the samples was performed using a single extract tandem solid-phase extraction procedure, based on the coupling of liquid-liquid extraction on diatomaceous earth with solid phase extraction applying propylsulphonic and octadecyl silica cartridges. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry was used as quantification technique, and the product ion full scan mass spectra provided by the ion trap mass analyser were used to confirm the identity of the analytes.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

The analytes determined were 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ, CAS No. 76180-98-6), 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoline (MeIQ, CAS No. 77094-11-2), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx, CAS No. 77500-04-0), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (4,8-DiMeIQx, CAS No. 95896-78-9), 2-amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (7,8-DiMeIQx, CAS No. 92180-79-5), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP, CAS No. 105650-23-5), 2-amino-1,6-dimethylimidazo[4,5-*b*]pyridine (DMIP), 1-methyl-9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (harman, CAS No. 485-84-0) and 9*H*-pyrido[3,4-*b*]indole (norharman, CAS No. 244-63-3), 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (A $\alpha$ C, CAS No. 26148-68-5), 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA $\alpha$ C, CAS No. 68806-83-7), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1, CAS No. 62450-06-0), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2, CAS No. 62450-07-1), 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1, CAS No. 67730-11-4) and 2-aminodipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-2, CAS No. 67730-10-3). 2-amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (TriMeIQx) was used as internal standard in the external calibration curves and for the standard addition method. Moreover, 2-amino-3-trideuteromethylimidazo[4,5-*f*]quinoline (D<sub>3</sub>-IQ), 2-amino-8-methyl-3-trideuteromethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline (D<sub>3</sub>-MeIQx) and 2-amino-1-trideuteromethyl-6-

phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (D<sub>3</sub>-PhIP) were used to determine the amount of the corresponding native analytes. All the HAs used were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada), and individual stock standard solutions of 130 µg g<sup>-1</sup> in methanol were prepared and used for further dilution.

The organic solvents (methanol, acetonitrile and dichloromethane), provided by Merck (Darmstadt, Germany), were HPLC grade, and the water was purified in an Elix-Milli Q system (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). The chemicals used for sample treatment (sodium hydroxide, hydrochloric acid and ammonium acetate, Merck, Darmstadt, Germany) and for mobile phase preparation (ammonium formate, formic acid, Merck, Darmstadt, Germany) were analytical grade, and highly pure He and N<sub>2</sub> (Air Liquide, Alcobendas, Spain) were used. All the solutions were passed through a 0.45 µm nylon filter (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA) before injection into the HPLC system.

Isolute reservoirs and Isolute HM-N diatomaceous earth refill material were obtained from IST (Hengoed, Mid-Glamorgan, UK). Isolute PRS (200 mg) and endcapped tridimensional Isolute C<sub>18</sub> (100 mg) cartridges were from IST (Hengoed, Mid-Glamorgan, UK). Bond Elut PRS (500 mg) and endcapped Bond Elut C<sub>18</sub> (100 and 500 mg) cartridges were from Varian Associates (Harbor City, USA). Coupling pieces and stopcocks were also purchased from Varian Associates (Harbor City, USA).

### **Food samples**

Three beef steaks (Sample A), of about 100 g weight and 0.5 cm thickness, were purchased from a local supermarket in Barcelona, Spain. The meat was immediately seasoned with salt and griddled in a teflon-coated frying pan, without adding oil. According to the Eurocode descriptor system (COST Action 99/EUROFOODS), griddling means cooking on a heated flat metal surface, with the optional addition of a small amount of fat or oil to grease the metal surface. The heat source was a gas cooker, and the temperature of the metal surface, maintained at 180-210°C, was monitored with a surface thermometer. The meat was cooked for 2 minutes per side to achieve a well done level, which was the preferred degree of doneness in a food frequency questionnaire. After the thermal processing, the weight loss represented about a 40 % of the initial weight. The three steaks were combined, cut up using a knife, ground with a food blender and stored at -18°C until analysis.

The other three griddled beef steak samples were obtained from three different restaurants (Samples B, C and D), specifying a well done degree of doneness. As the previous sample, each steak was cut up using a knife, ground with a food blender and stored at -18°C until applying sample treatment.

### **Extraction and purification**

Sample treatment, performed according to a previously published method (Toribio *et al.*, 2002), was slightly modified for its application to cooked meat samples. First, 60 mL 1 M NaOH were added to 30 g sample, and the mixture was homogenised using an Ultra-turrax stirrer (Ika-werke, Staufen, Germany). Then, a quantity equivalent to 3 g of meat were weighted in a vial and, after adding more sodium hydroxide (6 mL), the suspension was shaken for 2 h using a rotating shaker Rotary Mixer 34526 (Breda Scientific, Breda, The Netherlands). Afterwards, the alkaline solution was mixed with 14 g diatomaceous earth, and the blend was used to fill an empty column.

Then, the analytes were transferred to an Isolute PRS column by passing 75 mL dichloromethane through the tandem. After washing the cationic exchanger with 7 additional mL of clean dichloromethane, the column was washed with 15 mL methanol/water (4:6, v:v) and 2 mL water. HAs were then eluted to an Isolute C18 column with 20 mL of 0.5 M ammonium acetate at pH 8.5, and finally the analytes were transferred to a microvial using 0.8 mL of methanol/ammonia (9:1, v:v). This solution was gently evaporated to dryness under a stream of nitrogen, and HAs were redissolved with 80  $\mu$ L of a methanolic solution containing TriMeIQx and trideuterated IQ, MeIQx and PhIP.

To demonstrate the applicability of the proposed clean-up method to the analysis of HAs in cooked meat, sample A was also purified using the popular method developed by Gröss and Grüter (Gross and Grüter, 1992) and modified by Galceran (Galceran *et al.*, 1996). In this case, the eluate from the diatomaceous column were passed through a Bond Elut PRS cartridge, which was sequentially eluted with different solutions to provide two fractions containing the most and least polar HAs. Previously to the analysis, a preconcentration step using Bond Elut C18 cartridges was performed.

All the analytes were quantified by the standard addition method, using four fortified levels (around 3-12 ng g<sup>-1</sup>) and two non-spiked samples. Recovery was calculated with an external calibration curve, which was constructed using 7 standards with concentrations ranging from 0.01 to 1  $\mu$ g g<sup>-1</sup>. Moreover, IQ, MeIQx and PhIP were determined by isotopic dilution using the respective trideuterated compound.

## Identification and quantification

Amines were separated by reversed-phase LC using a TSK-Gel ODS 80TM column (5  $\mu$ m, 25.0 X 4.6 mm I.D.) (TosoHaas, Stuttgart, Germany) equipped with a Supelguard LC-8-DB precolumn (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The LC systems consisted of a Waters 2690 Separations Module (Waters, Milford, MA, USA), equipped with a quaternary solvent delivery system, an autosampler and an on-line vacuum degasser. Optimal conditions were achieved with a ternary mobile phase at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Solvent A: 30 mM formic acid/ammonium formate buffer at pH 3.25; solvent B: 30 mM formic acid/ammonium formate buffer at pH 3.7; solvent C: acetonitrile. The gradient elution 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 equilibration. In all cases, the injection volume was 15  $\mu$ L.

Identification and quantification of the analytes was performed using an ion trap mass analyser in MS/MS mode, as we described in a previous work (Toribio *et al.*, 2002). The instrument was an LCQ mass spectrometer (Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) which operated using Excalibur 1.0 SR1 software and was provided with an atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) source. To prevent mass spectrometer contamination when running LC-MS, a divert valve was used for a few minutes at the beginning of the chromatogram. Optimal source working conditions for monitoring positive ions were as follows: spray current was 5  $\mu$ A; heated capillary temperature was 150 °C, and vaporiser temperature was 450 °C; nitrogen was used as sheath gas at 72 l h<sup>-1</sup> (80 a.u.) and as auxiliary gas at 360 l h<sup>-1</sup> (20 a.u.). The ion transference through the optics and CID conditions were optimised by infusing methanolic solutions of the analytes. Maximum trapping efficiency was achieved using an isolation width of 1.5 *m/z*, and an optimum activation Q value of 0.45 was chosen to maximise the intensity of product ions. The optimal normalised collision energy values ranged from 36 % to 44 %, and 30 ms were selected as

activation time. The acquisition was performed in centroid mode, with a maximum injection time of 100 ms and 3 microscans. The masses scanned varied from  $m/z$  110 to  $m/z$  250 depending on the analyte, and quantification was carried out using the most intense product ions for each compound. The product ion full scan mass spectra provided by the ion trap mass analyser were used to confirm the identity of the analytes detected in the samples.

## RESULTS

### Validation of the single extract clean-up

To demonstrate the applicability of the single extract clean-up method to the analysis of cooked meat samples, sample A was also purified according to the method developed by Gross and Grüter (Gross and Grüter, 1992) and modified by Galceran (Galceran *et al.*, 1996). The quantity of HAs together with the corresponding recovery values, using the two purification techniques, are given in Table 1. For the single extract procedure, clean-up extraction efficiencies were about 25 % for quinolines (IQ and MeIQ) and for DMIP, and varied from 43 to 51 % for quinoxalines (MeIQx, 4,8-DiMeIQx and 7,8-DiMeIQx) and for PhIP. In the case of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\delta$ -carbolines ( $\alpha$ -carbolines: A $\alpha$ C and MeA $\alpha$ C;  $\beta$ -carbolines: harman and norharman;  $\delta$ -carbolines: Glu-P-1 and Glu-P-2), recoveries were in the range 48-60 %, whereas for  $\gamma$ -carbolines (Trp-P-1 and Trp-P-2) values ranging from 37 to 40 % were found. When applying the two extracts method, quinolines,  $\delta$ -carbolines and MeIQx presented recovery values in the range 27-32 %, and DMIP was only recovered in a 6 %. Most of the other HAs had extraction efficiencies ranging from 48 to 62 %, only Trp-P-1 had a lower value (41 %). Thus, the two clean-up procedures provided comparable recoveries for the major part of the analytes. Main differences were for DMIP,  $\delta$ -carbolines and MeIQx, whose extraction was improved using the single extract method, and for Trp-P-2, which presented a higher recovery with the method that yields two extracts. The low extraction efficiencies generally found in the analysis of the cooked meat sample can be due to macrocomponents of the matrix, such as lipids. These substances not only are capable of interacting with the analytes, but also can modify the selectivity of the different extraction and purification steps.

Although recovery values were different depending on the analyte and the clean-up method, quantification results were in agreement (Table 1). The analytes present in Sample A above their limit of quantification were MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Norharman, Harman, PhIP, Trp-P-1, A $\alpha$ C and MeA $\alpha$ C. Their trace chromatograms, obtained after using the single extract clean-up, are shown in Figure 1. The amount of MeIQx determined was about 2.5 ng g<sup>-1</sup>, that of 4,8-DiMeIQx 1.2 ng g<sup>-1</sup> and that of PhIP 6.4 ng g<sup>-1</sup>. The comutagenic HAs were found at a level of about 25.1 ng g<sup>-1</sup> (Norharman) and 5.6 ng g<sup>-1</sup> (Harman). The other HAs quantified, namely Trp-P-1, A $\alpha$ C and MeA $\alpha$ C, were present in the sample below 0.5 ng g<sup>-1</sup>. The rest of analytes were not detected (limits of detection: about 1 ng g<sup>-1</sup> for DMIP, 0.3 ng g<sup>-1</sup> for Glu-P-1 and Glu-P-2, and 0.1 ng g<sup>-1</sup> for IQ, MeIQ, 7,8-DiMeIQx and Trp-P-2), or could not be quantified as they were below their limit of quantification (DMIP and Trp-P-2). On the other hand, the use of labelled MeIQx and PhIP for the quantification of the respective native analytes significantly increased the precision of the results, decreasing the relative standard deviation values from 20 % to 8 % for MeIQx and from 11 to 5 % in the case of PhIP. As a conclusion, the consistent results provided by the two sample treatment

procedures indicate that the more simple single extract clean-up is a very convenient method for the analysis of HAs in cooked food samples.

Table 1.- Analysis of HAs in sample A. Standard deviation values given in brackets.

Analytes	Single extract method (Toribio <i>et al.</i> , 2002)		Two extracts method (Galceran <i>et al.</i> , 1996)	
	Recovery %	Amount ng g <sup>-1</sup>	Recovery %	Amount ng g <sup>-1</sup>
DMIP	25.4 (2.0)	n.q.	5.5 (1.3)	n.q.
Glu-P-2	59.6 (3.0)	n.d.	32.1 (1.8)	n.d.
IQ	26.3 (1.0)	n.d.	30.0 (1.1)	n.d.
IQ*	-	n.d.	-	n.d.
MeIQ	24.8 (1.3)	n.d.	26.6 (2.1)	n.d.
Glu-P-1	51.5 (2.4)	n.d.	29.4 (4.1)	n.d.
MeIQx	43.0 (3.7)	2.86 (0.69)	31.8 (1.8)	2.65 (0.51)
MeIQx*	-	2.44 (0.21)	-	2.06 (0.17)
7,8-DiMeIQx	45.5 (2.4)	n.d.	52.7 (4.0)	n.d.
4,8-DiMeIQx	51.3 (2.2)	1.27 (0.28)	47.5 (1.2)	1.16 (0.20)
Norharman	48.1 (6.0)	21.2 (3.1)	49.1 (8.5)	28.9 (5.9)
Harman	53.3 (5.9)	5.9 (1.2)	58.3 (6.3)	5.3 (1.2)
Trp-P-2	40.2 (1.8)	n.q.	50.9 (1.4)	n.q.
PhIP	47.9 (3.3)	6.99 (0.81)	54.8 (2.5)	5.18 (0.52)
PhIP*	-	7.12 (0.21)	-	6.25 (0.41)
Trp-P-1	36.7 (1.1)	0.35 (0.25)	40.9 (2.0)	0.45 (0.34)
A $\alpha$ C	54.3 (2.6)	0.33 (0.25)	60.9 (1.0)	0.40 (0.11)
MeA $\alpha$ C	57.0 (1.2)	0.15 (0.12)	61.9 (1.9)	0.31 (0.22)

n.d. Below its limit of detection.

n.q. Below its limit of quantification.

\* Quantified by isotopic dilution.

### Analysis of the restaurant cooked griddled beef steak samples

The amount of HAs in the restaurant samples B, C and D was also determined, and the results are given in Table 2. The identity of the analytes was confirmed using the product ion scan spectra of the chromatographic peaks, as shown in Figure 2 for the analytes quantified in Sample D. Some compounds, namely MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Norharman, Harman and PhIP were found in the three samples, at levels ranging from 0.7 to 2 ng g<sup>-1</sup>, from 0.2 to 1 ng g<sup>-1</sup>, from 2 to ng g<sup>-1</sup>, from 1.5 to 5.5 ng g<sup>-1</sup> and from 1.5 to 3.5 ng g<sup>-1</sup>, respectively. A $\alpha$ C was only present in Sample B and Sample D, at levels of 0.2 and 1.4 ng g<sup>-1</sup>, whereas Trp-P-1 was only quantified in Sample B (~ 0.3 ng g<sup>-1</sup>). The other HAs were not detected in any of the samples, or could not be quantified because they were below their limit of quantification. As previously, the use of trideuterated compounds allowed the obtention of highly precise data for MeIQx and PhIP. When comparing the content of HAs found in the restaurant cooked samples with that in Sample A, higher amounts of MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Norharman and MeA $\alpha$ C were present in the last sample, whereas similar quantities of Harman and Trp-P-1 were found in Samples A and D, and the highest amount of A $\alpha$ C was detected in Sample D. These variations can be due to differences in meat composition or to the introduction of additives, such as olive oil, when cooking the food.

Recovery values varied depending on the analyte and the sample, probably due to different meat composition. For example, DMIP showed an extraction efficiency of about 11 % in Samples B and C, whereas in Sample D it was 23 %. For  $\beta$ -carbolines, recovery values for Sample B, C and D varied from 48 % to 65 %. For other compounds, extraction efficiencies presented less variation

among different sample. For instance,  $\alpha$ -carbolines were recovered in a 38-48 %, and  $\delta$ -carbolines in a 37-44 %. When comparing with Sample A, slightly lower recoveries were obtained in Samples B, C and D for 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP,  $\alpha$ - and  $\delta$ -carbolines.

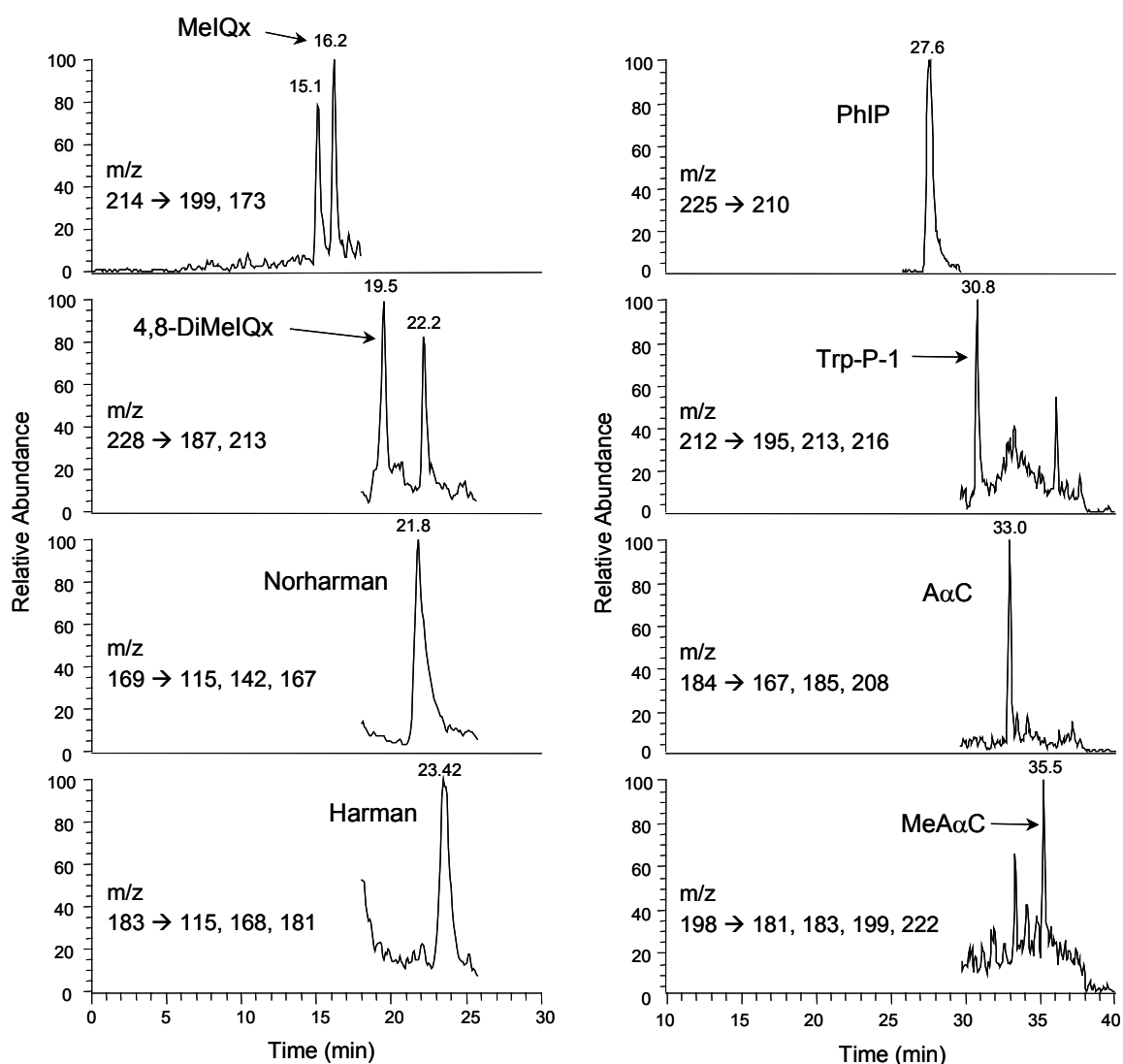


Figure 1.- Trace chromatograms of the analytes quantified in Sample A, obtained after application of the single extract clean-up. Experimental conditions: gradient elution in reversed-phase using a formic/formate buffer and acetonitrile. For further information see Materials and Methods section.

## DISCUSSION

In this work, we have demonstrated the applicability of the single extract clean-up procedure for the analysis of HAs in cooked food samples by comparing the results obtained in the analysis of a griddled beef steak with those achieved applying the widely used two extracts method. As shown in this study, both procedures provide consistent results, thus the more simple single extract method can be recommended to determine the content of mutagenic HAs in cooked food.

Moreover, the content of HAs in one griddled beef steak sample cooked under controlled conditions and three samples purchased from different restaurants was determined. MeIQx was quantified in all the samples at levels ranging from 0.9 to 2.4 ng g<sup>-1</sup>, whereas values for 4,8-DiMeIQx and PhIP were in the range 0.3-1.3 ng g<sup>-1</sup> and 2.1-7.1 ng g<sup>-1</sup>, respectively. Trp-P-1, AαC and MeAαC were quantified in some samples at levels below 0.5 ng g<sup>-1</sup>, except in the case of AαC in Sample D, where about 1.5 ng g<sup>-1</sup> were found. The comutagens Harman and Norharman were also found in all the samples, at concentration levels ranging from 1.9 to 5.9 ng g<sup>-1</sup> and from 2.4 to 21.2 ng g<sup>-1</sup>, respectively. Our results allow, in combination with the data obtained from food frequency questionnaires, to estimate the exposition to HAs derived from the consumption of griddled beef. As shown by the EPIC project (European Prospective Investigation into Nutrition Cancer and Health) (Rohrman *et al.*, 2002) the consumption of griddled beef in Spain is 2.3 g/day/person, which means that the daily intake of HAs *per capita* derived from this cooked meat dish is 49.0 ng.

The concentration of HAs found in our work agree with several publications that report very low amounts of IQ and higher amounts of MeIQx, 4,8-DiMeIQx and PhIP in fried beef samples (Felton *et al.*, 1994; Heddle *et al.*, 2001; Knize *et al.*, 1994; Wakabayashi *et al.*, 1993; Zimmerli *et al.*, 2001), being PhIP the more concentrated followed by MeIQx. However, in most of these works only a reduced number of compounds are analysed, usually quinolines, quinoxalines and PhIP. As we showed in our work, carbolines are also present in cooked foods, and sometimes at a very high concentration level. In another work, Skog *et al.* (Skog *et al.*, 1997) also reported the formation of some carbolines, mainly β- and γ-carbolines, in several cooked meat products. Therefore, the accurate estimation of the dietary intake of HAs requires the analysis of a wide number of analytes, including the usually determined AIAs but also the carbolines.

Table 2.- Recovery values and amount of HAs found in Samples B, C and D. Standard deviation values given in brackets.

Analytes	Sample B		Sample C		Sample D	
	Recovery %	Amount ng g <sup>-1</sup>	Recovery %	Amount ng g <sup>-1</sup>	Recovery %	Amount ng g <sup>-1</sup>
DMIP	10.4 (3.0)	n.q.	10.4 (1.1)	n.d.	23.0 (0.2)	n.q.
Glu-P-2	43.4 (1.0)	n.d.	37.9 (1.6)	n.d.	39.1 (2.0)	n.d.
IQ	10.4 (1.1)	n.d.	20.4 (1.1)	n.d.	16.4 (0.8)	n.d.
IQ*	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.
MeIQ	11.6 (1.2)	n.d.	23.1 (1.0)	n.d.	15.9 (0.6)	n.d.
Glu-P-1	41.8 (1.3)	n.d.	36.9 (1.8)	n.d.	40.3 (1.3)	n.d.
MeIQx	35.4 (1.1)	1.17 (0.19)	41.0 (1.7)	1.70 (0.30)	41.2 (1.3)	0.78 (0.24)
MeIQx*	-	0.96 (0.10)	-	1.75 (0.18)	-	0.94 (0.13)
7,8-DiMeIQx	36.4 (1.9)	n.d.	37.5 (0.7)	n.d.	38.4 (1.2)	n.d.
4,8-DiMeIQx	38.7 (1.4)	0.72 (0.24)	44.7 (1.2)	0.66 (0.17)	43.7 (1.0)	0.28 (0.16)
Norharman	48.3 (3.5)	2.42 (0.59)	50.6 (3.2)	3.23 (0.54)	52.7 (4.4)	12.9 (1.5)
Harman	50.4 (4.1)	1.90 (0.62)	56.9 (3.0)	3.30 (0.46)	64.8 (5.0)	5.31 (0.83)
Trp-P-2	30.8 (2.1)	n.q.	37.1 (1.1)	n.q.	26.9 (0.8)	n.d.
PhIP	30.6 (1.4)	3.49 (0.44)	24.7 (0.9)	3.26 (0.32)	39.5 (1.2)	1.73 (0.24)
PhIP*	-	3.17 (0.23)	-	3.01 (0.14)	-	2.10 (0.15)
Trp-P-1	24.7 (1.4)	0.35 (0.33)	34.4 (1.6)	n.d.	22.8 (0.7)	n.d.
AαC	44.2 (1.3)	0.18 (0.16)	41.0 (2.2)	n.d.	38.5 (1.1)	1.41 (0.19)
MeAαC	48.0 (1.3)	n.q.	45.9 (1.8)	n.d.	45.6 (0.9)	n.q.

n.d. Below its limit of detection.

n.q. Below its limit of quantification.

\* Quantified by isotopic dilution.

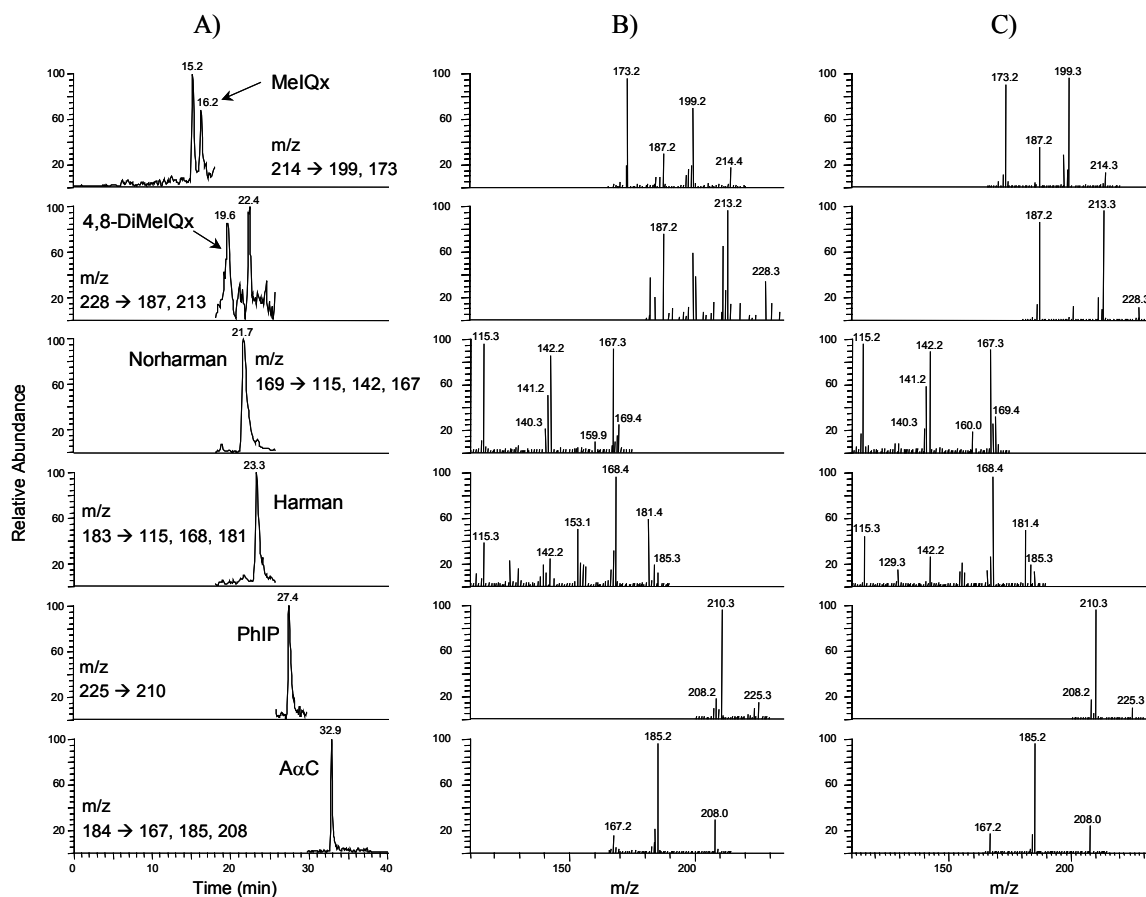


Figure 2.- A) Trace chromatograms of sample D. Experimental conditions: gradient elution in reversed-phase using a formic/formate buffer and acetonitrile. For further information see Materials and Methods section. B) Product ion scan spectra of the analytes in the sample; C) Product ion scan spectra corresponding to standards.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out with financial support from the Commission of the European Community, specific RTD programme “Quality of Life and Management of Living Resources”, project QLK1-CT99-01197 “Heterocyclic Amines in Cooked Foods-Role in Human Health”. Financial support has been also provided by the Ministerio de Ciencia y Tecnología, project AGL2000-0948. The authors also want to thank Dr. Olga Jáuregui from the Serveis Científico-Tècnics for her valuable technical and scientific help.

## REFERENCES

- Arvidsson P., Van Boekel M. A. J. S., Skog K., and Jägerstad M. (1997) Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system. *Journal of Food Science* **62**, 911-916.
- Borgen E., Solyakov A., and Skog K. (2001) Effects of precursor composition and water on the formation of heterocyclic amines in meat model systems. *Food Chemistry* **74**, 11-19.

- Chiu C. P., Yang D. Y., and Chen B. H. (1998) Formation of heterocyclic amines in cooked chicken legs. *Journal of Food Protection* **61**, 712-719.
- Felton J. S., Fultz E., Dolbeare F. A., and Knize M. G. (1994) Effect of microwave pretreatment on heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology* **32**, 897-903.
- Felton J. S., Knize M. G., Wood C., Wuebbles B. J., Healy S. K., Stuermer D. H., Bjeldanes L. F., Kimble B. J., and Hatch F. T. (1984) Isolation and characterization of new mutagens from fried beef. *Carcinogenesis* **5**, 95-102.
- Felton J. S., Wu R., Knize M. G., Thomson L. H., and Hatch F. T. (1995) HA mutagenicity/carcinogenicity: influence of repair, metabolism and structure. In: Adamson, R.H.; Gustafsson, J.A.; Ito, N.; Nagao, M.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; Yamazoe, Y (Eds), Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, pp. 50-58.
- Galceran M. T., Pais P., and Puignou L. (1996) Isolation by solid-phase extraction and liquid-chromatographic determination of mutagenic amines in beef extracts. *Journal of Chromatography A* **719**, 203-212.
- Gross G. and Grüter (1992) Quantitation of mutagenic haas in food products. *Journal of Chromatography* **592**, 271-278.
- Hatch F. T. (1986) A current genotoxicity database for HAs. I. Genetically relevant endpoints. In: Adamson, R.H.; Gustafsson, J.A.; Ito, N.; Nagao, M.; Sugimura, T.; Wakabayashi, K.; Yamazoe, Y (Eds), Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation. Princeton Scientific Publishing, Princeton, NJ, pp. 93-103.
- Heddle J. A., Knize M. G., Dawod D., and Zhang X. B. (2001) A test of the mutagenicity of cooked meats in-vivo. *Mutagenesis* **16**, 103-107.
- IARC (1987) Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42. IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Suppl. 7, pp. 64-73.
- IARC (1993) Some natural occurring substances: food items and constituents. Heterocyclic amines and mycotoxins. IARC monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to humans. International Agency for Research on Cancer, Lyon, Vol. 56, pp. 165-231.
- Imaida K., Sano M., Tamano S., Asamoto M., Ogawa K., Futakuchi M., and Shirai T. (2001) Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) - Positive effects on the intestine but not the prostate. *Carcinogenesis* **22**, 1295-1299.
- Keating G. A., Layton D. W., and Felton J. S. (1999) Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **443**, 149-156.
- Knize M. G., Dolbeare F. A., Carroll K. L., Moore D. H., and Felton J. S. (1994) Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology* **32**, 595-603.
- Knize M. G., Salmon C. P., Pais P., and Felton J. S. (1999) Impact of processing on food safety. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **459**, 179-193.
- Mitjans D. (2002) Master Thesis: Evaluation of the daily intake of has derived from the consumption of cooked chicken. Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Rohrmann S., Linseisen J., Becker N., Norat T., Sinha R., Skeie G., Lund E., Martinez C., Barricarte A., Mattisson I., Berglund G., Welch A., Davey G., Overvad K., Tjonneland A., Clavelchapelon F., Kesse E., Lotze G., Klipsteingrobusch K., Vasilopoulou E.,

- Polychronopoulos E., Pala V., Celentano E., Buenodemesquita H.B., Peeters P.H.M., Riboli E., Slimani N. (2002) Cooking of Meat and Fish in Europe - Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) *European Journal of Clinical Nutrition* **56**, 1216-1230.
- Ryu D. Y., Pratt V. S. W., Davis C. D., Schut H. A. J., and Snyderwine E. G. (1999) In-vivo mutagenicity and hepatocarcinogenicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo(4,5-f)quinoxaline (MeIQx) in bitransgenic c-myc/ lambda-lacZ mice. *Cancer Research* **59**, 2587-2592.
- Schut H. A. J. and Snyderwine E. G. (1999) DNA-adducts of heterocyclic amine food mutagens - Implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* **20**, 353-368.
- Sinha R., Knize M. G., Salmon C. P., Brown E. D., Rhodes D., Felton J. S., Levander O. A., and Rothman N. (1998) Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 289-297.
- Skog K. (1993) Cooking procedures and food mutagens - A literature-review. *Food and Chemical Toxicology* **31**, 655-675.
- Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., and Jägerstad M. (1997) Polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food and Chemical Toxicology* **35**, 555-565.
- Skog K., Johansson M. A. E., and Jägerstad M. I. (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods - A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology* **36**, 879-896.
- Skog K., Solyakov A., and Jägerstad M. (2000) Effects of heating conditions and additives on the formation of heterocyclic amines with reference to amino-carbolines in a meat juice model system. *Food Chemistry* **68**, 299-308.
- Toribio F., Moyano E., Puignou L., and Galceran M. T. (2002) Ion-trap tandem mass-spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography A* **948**, 267-281.
- Wakabayashi K., Totsuka Y., Fukutome K., Oguri A., Ushiyama H., and Sugimura T. (1997) Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic beta-carbolines. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **376**, 253-259.
- Wakabayashi K., Ushiyama H., Takahashi M., Nukaya H., Kim S. B., Hirose M., Ochiai M., Sugimura T., and Nagao M. (1993) Exposure to heterocyclic amines. *Environmental Health Perspectives* **99**, 129-133.
- Zimmerli B., Rhyh P., Zoller O., and Schlatter J. (2001) Occurrence of heterocyclic aromatic-amines in the swiss diet - Analytical method, exposure estimation and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* **18**, 533-551.