

# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1. LAS AMINAS HETEROCÍCLICAS

Las aminas heterocíclicas (HAs) son una familia de compuestos que han atraído la atención de numerosos científicos desde su descubrimiento en 1977, cuando fueron extraídas de sardinas asadas. En aquel entonces se demostró que estas sustancias eran potentes mutágenos, y más tarde se observó que su administración inducía el desarrollo de tumores en animales de laboratorio. Además, son numerosos los estudios epidemiológicos que sugieren una relación directa entre el cáncer y el consumo de carne o pescado cocinados, que son la principal fuente de ingesta de HAs por parte del ser humano. Estas evidencias llevan a considerar que estas aminas son posibles cancerígenos en humanos.

La investigación de las HAs abarca diversos campos que incluyen su formación, toxicidad *in-vivo* e *in-vitro* o metabolismo entre otros. Uno de los aspectos más relevantes para la evaluación de la importancia de las HAs en la etiología del cáncer es el establecimiento de la ingesta diaria de estos compuestos, a partir de datos de consumo y de niveles de concentración. Dado que las HAs se generan a baja concentración (0-100 ng g<sup>-1</sup>), es necesario desarrollar metodología analítica altamente sensible y selectiva que permita determinar fiablemente su contenido en los alimentos.

### 1.1.1. La dieta y el cáncer

Nuestra dieta comprende una compleja mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, las cuales no sólo nos proporcionan sustento sino que también pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo, modulación y prevención de enfermedades como por ejemplo el cáncer (Sugimura, 1995). Tras numerosos estudios, hoy en día se acepta que entre el 70 y el 80 % de los cánceres humanos están relacionados con el estilo de vida (Gooderham *et al.*, 1996), tal y como se muestra en la Tabla 1.1. Dentro de este subapartado destaca el tabaco, que contribuye a un 30 % de los casos, especialmente los de pulmón aunque también los de páncreas, vejiga, riñones, cavidad bucal y esófago. Sin embargo, el factor de mayor contribución es la dieta, la cual se puede relacionar con el 35-45 % de los cánceres, especialmente los colorectales y los de páncreas, próstata, mama, ovario y endometrio (Weisburger *et al.*, 1995). Por supuesto, este hecho ha llevado a la necesidad de determinar cuáles son los agentes de la dieta responsables de la carcinogenicidad.

La alimentación puede contribuir positivamente a la tumorigénesis de dos maneras (Wakabayashi *et al.*, 1998). Por un lado, varios macrocomponentes de los alimentos, como por ejemplo la grasa o el cloruro de sodio, pueden ayudar a la aparición de cáncer en el colon o en el estómago, respectivamente. Por otro lado, en la dieta se encuentran un gran número de microcomponentes capaces de dañar el material genético celular, lo cual puede derivar en la formación de tumores tras un complejo proceso. Por supuesto, en los alimentos también se encuentran numerosas sustancias anticancerígenas que retrasan o dificultan la producción de genotoxinas, su interacción con el DNA o la progresión de la células malignas.

Tabla 1.1.- Porcentajes aproximados de los factores implicados en la génesis de cáncer en seres humanos (Gooderham *et al.*, 1996).

<b>Causas de cáncer</b>	<b>Porcentajes</b>
Estilo de vida	70-80
Tabaco	~ 30
Dieta	35-45
Ocupacionales	< 10
Iatrogénicas (radiaciones)	< 10
Criptogénicas (virus)	< 10

Las genotoxinas presentes en la dieta pueden ser de origen natural, como las micotoxinas, pueden proceder de fuentes externas, como algunos pesticidas, o bien se pueden formar durante el procesado de los alimentos (Ferguson, 1999). En este último grupo se incluyen compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los N-nitrosocompuestos y las aminas heterocíclicas (HAs). Estos compuestos se transforman por la acción de enzimas celulares en metabolitos altamente electrofílicos capaces de interaccionar covalentemente con el material genético. Compitiendo con este proceso de activación, existen vías de detoxificación que convierten a los analitos en sustancias que son excretadas del organismo.

### 1.1.2. Descubrimiento de las HAs

La mayoría de compuestos carcinógenos (capaces de desarrollar tumores) son además mutágenos (capaces de provocar alteraciones del material genético) (Hatch *et al.*, 1992). En 1975, Bruce N. Ames describió un sencillo test que permitía cuantificar la actividad mutagénica de sustancias mediante el uso de bacterias (*Salmonella typhimurium*) (Ames *et al.*, 1975). Dichas bacterias habían sido modificadas genéticamente de manera que requerían histidina para su reproducción. Al no incorporar este nutriente al sistema de incubación, únicamente las células que habían mutado eran capaces de reproducirse. El número de colonias generado daba por tanto idea de la potencia mutagénica de la sustancia estudiada. En el caso de moléculas potencialmente mutagénicas que requiriesen una activación metabólica, bastaba con incorporar homogeneizados de hígado que contenían enzimas metabolizantes. Se observó que la potencia mutagénica indicada por el test de Ames podía correlacionarse con propiedades carcinogénicas, por lo que dicho test de mutagenicidad se desveló como una manera rápida y económica de identificar compuestos posiblemente cancerígenos para el ser humano.

Poco después del desarrollo del test de Ames, diversos científicos investigaban la mutagenicidad del humo de tabaco, el cual se sabía que era una de las principales causas de cáncer en seres humanos. El estudio estructural de las moléculas orgánicas derivadas de la pirólisis del tabaco reveló la presencia de varios tipos de agentes cancerígenos, incluyendo algunos PAHs. Este hecho hizo pensar que quizá el humo originado durante el cocinado de alimentos también podía presentar actividad mutagénica. Esto se confirmó cuando en 1977 Sugimura y sus colaboradores analizaron las partículas retenidas en un filtro de fibra de vidrio a través del cual se había hecho pasar el humo desprendido durante el asado de sardinas (Nagao *et al.*, 1977). Sin embargo, el ensayo de mutagenicidad con *Salmonella typhimurium* indicó que la actividad era mucho mayor a la teóricamente esperada teniendo en cuenta la presencia de PAHs. También se observó una elevada mutagenicidad en las partes más hechas de carne y pescado asado, y se correlacionó con la presencia de proteínas y aminoácidos. El siguiente paso fue por tanto el aislamiento de las sustancias mutagénicas de pirolizados de aminoácidos y proteínas principalmente mediante el uso de la cromatografía de líquidos a escala preparativa combinada con el test de Ames. Los compuestos aislados resultaron tener propiedades básicas y una estructura aromática con heteroátomos, por lo que fueron denominados aminas heterocíclicas (HAs). Así, la Trp-P-1 y la Trp-P-2 (Tabla 1.2) se identificaron como mutágenos producto de la pirólisis del

triptófano (Sugimura *et al.*, 1977), mientras que la Glu-P-1 y la Glu-P-2 se originaron en la pirólisis del ácido glutámico (Yamamoto *et al.*, 1978). Al mismo tiempo, un grupo de trabajo perteneciente a la Compañía Japonesa de Tabaco y Salud Pública que estaban estudiando la mutagenicidad en el humo del tabaco identificaron la A $\alpha$ C y la MeA $\alpha$ C como mutágenos procedentes de la pirólisis de semillas de soja (Yoshida *et al.*, 1978). A continuación se llevó a cabo el aislamiento de los mutágenos directamente de alimentos cocinados. Por ejemplo, la IQ y MeIQ se identificaron en sardinas asadas (Kasai *et al.*, 1979), la MeIQx en ternera frita (Kasai *et al.*, 1981) y más tarde la PhIP en carne magra de ternera frita (Felton *et al.*, 1986b). Además, se aislaron otros compuestos a partir de mezclas de aminoácidos, glucosa y creatinina tras ser calentadas (sistemas modelo), indicando que estos podrían ser los precursores de algunas HAs. La lista completa de los más de 20 mutágenos incluidos en esta familia se indican en la Tabla 1.2, donde además se indica el año de su descubrimiento y la fuente de origen.

### 1.1.3. Toxicidad de las HAs

Tras el aislamiento y la caracterización de los compuestos responsables de la actividad mutagénica de los alimentos cocinados, se sintetizaron cantidades suficientes de HAs que permitieron llevar a cabo estudios de toxicidad tanto *in vivo* como *in vitro*. Se observó que las HAs eran promutágenos, es decir, que requerían una activación metabólica para interaccionar covalentemente con el DNA (Snyderwine *et al.*, 1992). Numerosos estudios (Alexander *et al.*, 1995; Snyderwine *et al.*, 1997) han permitido esclarecer que el proceso de activación de las HAs se inicia con la N-hidroxilación del grupo amino exocíclico por parte del citocromo P450IA2 presente en el hígado. A continuación, el metabolito se transporta a otro tejido como el colon o las mamas, donde se produce una esterificación con sulfato o acetato. Esta última especie, al hidrolizarse más tarde, da origen a una molécula altamente electrófila, que es la que interacciona con el material genético. Este aducto puede a continuación ser reparado o ignorado, pero también puede dar lugar a errores de replicación durante la reproducción celular, originando una mutación. Si esta alteración genética se produce en genes críticos para el ciclo celular, se podría originar un proceso cancerígeno. En la Figura 1.1 se esquematiza a modo de ejemplo el complejo sistema de rutas metabólicas de la PhIP, incluyendo las vías de activación y detoxificación (Strickland *et al.*, 1995; Felton *et al.*, 2002). Debido a factores medioambientales o genéticos, la abundancia de uno u otro metabolito puede variar, lo que

provoca que la susceptibilidad individual a la carcinogénesis provocada por microcontaminantes sea diferente (Kadlubar *et al.*, 1992).

Tabla 1.2.- Nombre completo, abreviatura, año de descubrimiento de las aminas mutagénicas y fuente de la que se aislaron por primera vez.

Nombre	Abreviatura	Fuente de origen	Ref.
3-amino-1,4-dimetil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]indol	Trp-P-1	Triptófano pirolizado	(Sugimura <i>et al.</i> , 1977)
3-amino-1-metil-5 <i>H</i> -pirido[4,3- <i>b</i> ]indol	Trp-P-2	Triptófano pirolizado	(Sugimura <i>et al.</i> , 1977)
2-amino-5-fenilpiridina	Phe-P-1	Fenilalanina pirolizada	(Sugimura <i>et al.</i> , 1977)
2-amino-6-metildipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol	Glu-P-1	Ácido glutámico pirolizado	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1978)
2-aminodipirido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol	Glu-P-2	Ácido glutámico pirolizado	(Yamamoto <i>et al.</i> , 1978)
3,4-ciclopentenopirido[3,2- <i>a</i> ]carbazol	Lys-P-1	Lisina pirolizada	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1978)
2-amino-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i> ]indol	AαC	Globulina pirolizada	(Yoshida <i>et al.</i> , 1978)
2-amino-3-metil-9 <i>H</i> -pirido[2,3- <i>b</i> ]indol	MeAαC	Globulina pirolizada	(Yoshida <i>et al.</i> , 1978)
2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinolina	IQ	Sardina asada	(Kasai <i>et al.</i> , 1979)
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinolina	MeIQ	Sardina asada	(Kasai <i>et al.</i> , 1979)
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalina	MeIQx	Ternera frita	(Kasai <i>et al.</i> , 1981)
4-amino-6-metil-1 <i>H</i> -2,5,10,10 <i>b</i> -tetraazafluoranteno	Orn-P-1	Omitina pirolizada	(Sugimura <i>et al.</i> , 1983b)
2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalina	7,8-DiMeIQx	Mezcla calentada de creatinina, glicina y glucosa	(Negishi <i>et al.</i> , 1984)
2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalina	4,8-DiMeIQx	Mezcla calentada de creatinina, treonina y glucosa	(Negishi <i>et al.</i> , 1985)
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina	PhIP	Ternera frita	(Felton <i>et al.</i> , 1986b)
2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalina	IQx	Producto cárnico Noruego frito	(Becher <i>et al.</i> , 1988)
4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pirrolo[3,4- <i>f</i> ]benzimidazol-5,7- <i>d</i> iona	Cre-P-1	Creatina pirolizada	(Nukaya <i>et al.</i> , 1991)
2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalina	TriMeIQx	Mezcla calentada de creatinina, alanina, treonina y glucosa	(Skog <i>et al.</i> , 1992b)
2-amino-1-metil-6-(4-hidroxifenil)imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina	4'-OH-PhIP	Ternera asada	(Kurosaka <i>et al.</i> , 1992)
2-amino-1,6-dimetilfuro[3,2- <i>e</i> ]imidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina	IFP	Ternera, creatina y leche fritos	(Knize <i>et al.</i> , 1990)
2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina	DMIP	Producto cárnico Noruego frito	(Becher <i>et al.</i> , 1988)
2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i> ]piridina	TMIP	Producto cárnico Noruego frito	(Becher <i>et al.</i> , 1988)
2-amino-4-hidroximetil-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxalina	4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx	Extracto de carne	(Nukaya <i>et al.</i> , 1994)
2-amino-1,7,9-trimetilimidazo[4,5- <i>g</i> ]quinoxalina	7,9-DiMeIqQx	Extracto de carne	(Nukaya <i>et al.</i> , 1994)

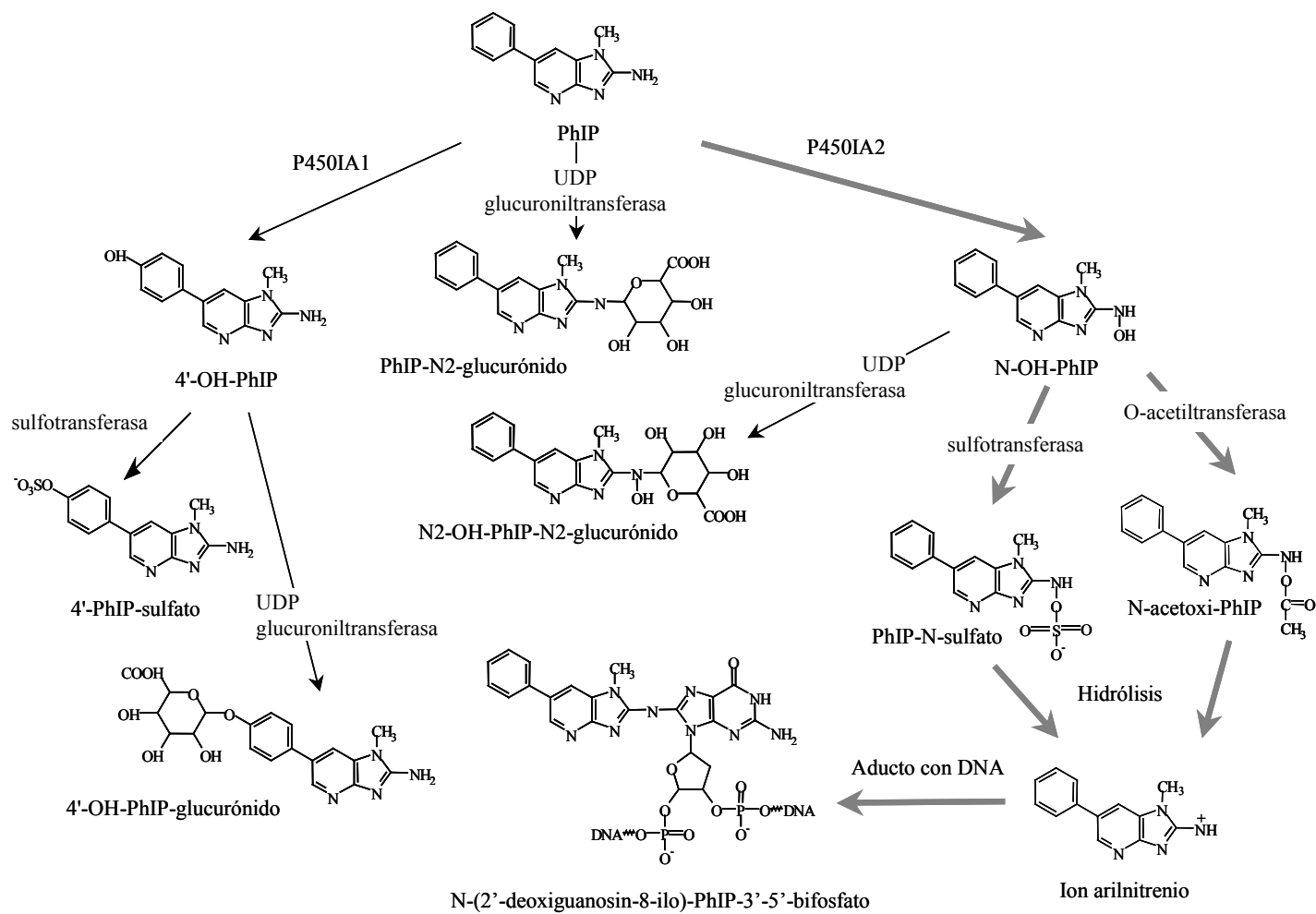


Figura 1.1.- Posibles rutas metabólicas de la PhIP en el ser humano. La vía de activación se indica en un trazo más grueso de color gris.



Con el fin de predecir la carcinogenicidad de las HAs en humanos, se desarrollaron modelos de laboratorio que incluían tests de mutagenicidad. Entre ellos, el más ampliamente utilizado ha sido el test de Ames. En la Tabla 1.3 se indica la potencia mutagénica de las HAs con un sistema metabólico S9 y dos tipos de *Salmonella typhimurium*, una sensible a las mutaciones de eliminación (TA98) y otra a las de sustitución (TA100) (Sugimura *et al.*, 1983a). En esta tabla se puede observar que las HAs tienen mayor respuesta en el sistema TA98, y que la mutagenicidad específica de algunas HAs es considerablemente superior a la de algunos mutágenos/carcinógenos, como la aflatoxina B1 y el benzo[a]pireno. Varios estudios han puesto de manifiesto que la potencia mutagénica de las HAs está relacionada con factores estructurales, como por ejemplo la extensión del sistema aromático y el número y posición de los sustituyentes (Colvin *et al.*, 1998; Hatch *et al.*, 2001).

Tabla 1.3.- Mutagenicidades, expresadas en *Revertants*  $\mu\text{g}^{-1}$ , de las HAs y de algunos carcinógenos típicos en *Salmonella typhimurium* TA98 y TA100 (Nagao, 1999).

Compuesto	TA98	TA100
MeIQ	661.000	30.000
IQ	433.000	7.000
4,8-DiMeIQx	183.000	8.000
7,8-DiMeIQx	163.000	9.900
MeIQx	145.000	14.000
Trp-P-2	104.000	1.800
4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx	99.000	3.000
IQx	75.000	1.500
Orn-P-1	56.800	
Glu-P-1	49.000	3.200
Trp-P-1	39.000	1.700
Cre-P-1	19.000	400
Glu-P-2	1.900	1.200
PhIP	1.800	120
7,9-DiMeIgQx	540	
A $\alpha$ C	300	20
MeA $\alpha$ C	200	120
Phe-P-1	41	23
4'-OH-PhIP	2	
Aflatoxina B1	6.000	28.000
4-Nitroquinolina 1-oxido	970	9.900
Benzo[a]pireno	320	660

A pesar de la simplicidad del test de Ames y de la demostrada correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad, no todas las sustancias que provocan mutaciones dan lugar a un proceso tumorigénico. Es por ello que muchos científicos han realizado ensayos de carcinogenicidad a largo plazo con animales, incluyendo ratas, ratones e incluso monos (Ryu *et al.*, 1999; Imaida *et al.*, 2001). Así, diversas HAs han dado resultados positivos en varios órganos, tal como se indica en la Tabla 1.4, donde también se incluye la potencia carcinogénica en ratas y ratones expresada como TD<sub>50</sub> (dosis diaria administrada a lo largo de toda la vida del animal que induce tumores en un 50 % de la población) (Sugimura *et al.*, 2000).

Tabla 1.4.- Carcinogenicidad de las HAs testeadas en roedores (Sugimura *et al.*, 2000).

Compuesto	Ratas		Ratones	
	Potencia TD <sub>50</sub> (mg/kg/día)	Órganos afectados por tumores	Potencia TD <sub>50</sub> (mg/kg/día)	Órganos afectados por tumores
IQ	0,7	hígado,intestino,glándula Zymbal,clítoris,piel	14,7	hígado,estómago, pulmón
MeIQ	0,1	Intestino,piel,boca, glándula mamaria,glándula Zymbal	8,4	hígado,estómago
MeIQx	0,7	hígado,glándula Zymbal,clítoris,piel	11,0	hígado,pulmón,sistema circulatorio
PhIP	0,9	intestino,glándula mamaria	31,3	tejido linfático
A $\alpha$ C	-	hígado,sistema circulatorio	15,8	-
MeA $\alpha$ C	6,4	hígado	5,8	hígado,sistema circulatorio
Trp-P-1	0,1	hígado	8,8	hígado
Trp-P-2	-	hígado,vejiga urinaria	2,7	hígado
Glu-P-1	0,8	hígado,intestino,glándula Zymbal,clítoris	2,7	hígado,sistema circulatorio
Glu-P-2	5,7	hígado,intestino,glándula Zymbal,clítoris	4,9	hígado,sistema circulatorio

Sin embargo, las elevadas dosis a las que se administran los mutágenos y el diferente metabolismo en animales y humanos, provocan ciertas dudas sobre los resultados obtenidos de los experimentos a largo plazo *in-vivo*, por lo que se han realizado numerosos estudios epidemiológicos enfocados a relacionar las HAs con ciertos tipos de cáncer (Stavric, 1994). Otra alternativa es la búsqueda de biomarcadores que ayuden a interpretar el papel que desempeñan las aminas mutágenas en la génesis de tumores (Strickland *et al.*, 1995). Así, se han analizado muestras biológicas con el fin de utilizar los metabolitos como

marcadores de exposición y susceptibilidad (Lynch *et al.*, 1992), y también se ha propuesto el análisis de aductos de HAs con proteínas y DNA con el mismo fin (Turesky *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 2002).

#### 1.1.4. Formación de las HAs

El cocinado de la carne y el pescado se realiza generalmente para mejorar sus cualidades organolépticas, ya que durante el calentamiento el alimento se oscurece y se generan sustancias de agradable olor y sabor. Las reacciones que dan lugar a este proceso, englobadas bajo el nombre de reacciones de Maillard, se producen mayoritariamente en las partes superficiales, ya que es donde más elevada es la temperatura y más bajo el contenido de agua. Las reacciones de Maillard, también denominadas "oscurecimiento no enzimático", incluyen la condensación de azúcares y aminoácidos. A continuación, una reorganización de Amadori y una degradación de Strecker originan la formación de piridinas, pirazinas y aldehídos (Skog *et al.*, 1992b; Friedman, 1996). Sin embargo, otra de las consecuencias del proceso de cocción de los alimentos es la aparición de actividad mutagénica, lo cual se atribuye a la formación de las HAs.

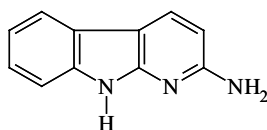
#### Carbolinas y aminoimidazozaarenos

Según su estructura y mecanismo de generación, las HAs se pueden agrupar en dos subfamilias:

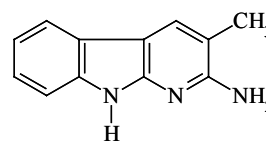
a) Carbolinas. Las estructuras de los compuestos de esta familia, conocidos también como aminas pirolíticas, se muestran en la Figura 1.2. Las carbolinas se producen a temperaturas superiores a 300°C por la pirólisis de aminoácidos y proteínas mediante una reacción radicalaria. Generalmente, estas HAs tienen un grupo amino primario unido a un anillo piridínico, el cual a su vez está fusionado con un indol o un imidazol. En esta subfamilia se incluyen la harman y la norharman, dos  $\beta$ -carbolinas que, aunque no son mutagénicas debido a la ausencia del grupo amino primario, poseen la capacidad de potenciar la mutagenicidad de algunas HAs. Estos co-mutágenos pueden incluso formar aductos con el ADN en presencia de otras aminas aromáticas no mutagénicas, como la anilina o la o-toluidina (Barnes *et al.*, 1983a). Se ha propuesto en la bibliografía que las  $\beta$ -carbolinas se forman a partir de la pirólisis del triptófano (Herraiz, 2000b), tal y como se muestra en la Figura 1.3.

## Piridoindoles

$\alpha$ -carbolinas

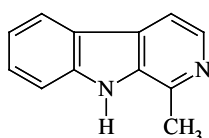


**A $\alpha$ C**

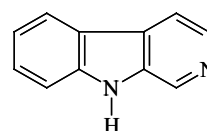


**MeA $\alpha$ C**

$\beta$ -carbolinas

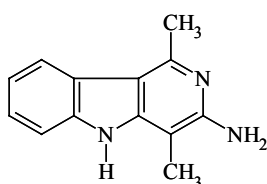


**Harman**

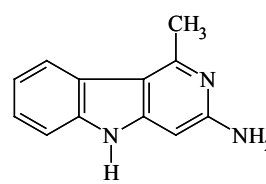


**Norharman**

$\gamma$ -carbolinas



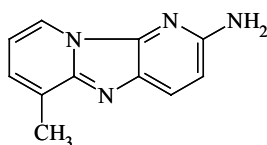
**Trp-P-1**



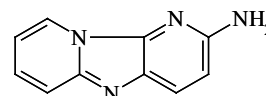
**Trp-P-2**

## Piridoimidazoles

$\delta$ -carbolinas

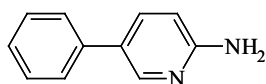


**Glu-P-1**



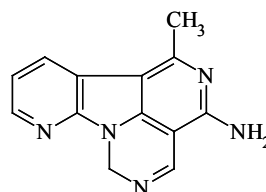
**Glu-P-2**

## Fenilpiridinas



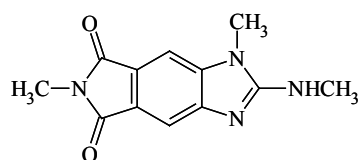
**Phe-P-1**

## Tetraazafluoranteno



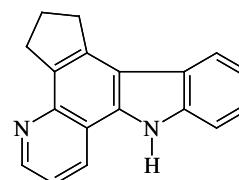
**Orn-P-1**

## Benzimidazol



**Cre-P-1**

## Carbazol



**Lys-P-1**

Figura 1.2.- Estructura de las carbolinas o aminas pirolíticas.

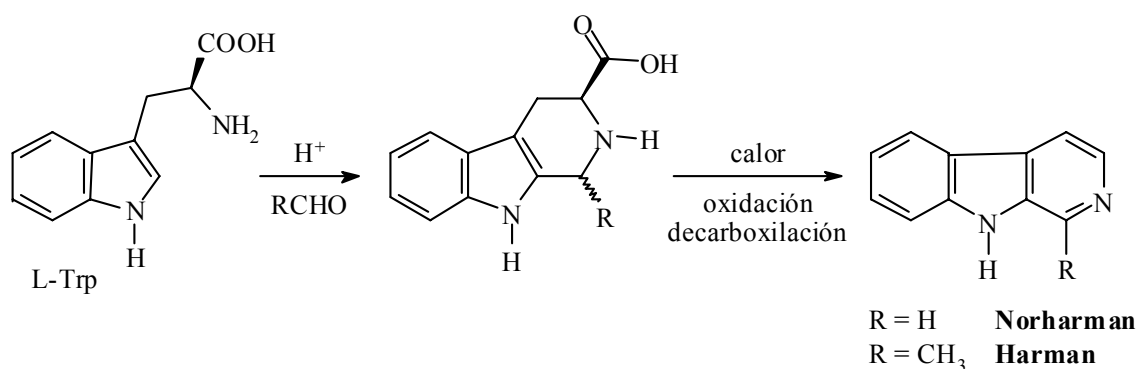
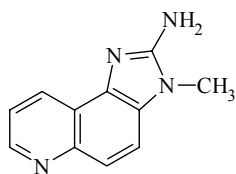


Figura 1.3.- Esquema del mecanismo de formación de las  $\beta$ -carbolinas a partir de la pirólisis del L-Trp.

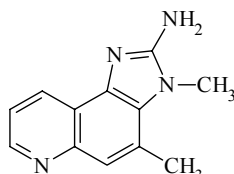
Aunque para las demás carbolinas el mecanismo no está totalmente esclarecido, se sabe que las  $\alpha$ - y  $\gamma$ -carbolinas se forman en la pirólisis de triptófano o de proteínas de origen tanto animal como vegetal. A su vez, Phe-P-1, Lys-P-1, Orn-P-1 y Cre-P-1 se originan en la pirólisis de la fenilalanina, lisina, ornitina y creatina, respectivamente (Skog *et al.*, 2000).

b) Aminoimidazoazaarenos (AIAs). Estos mutágenos se forman a temperaturas normales de cocinado, y por ello se designan también como aminas térmicas. Los AIAs contienen en su estructura un grupo metilaminoimidazólico, tal y como se puede apreciar en la Figura 1.4. Los mutágenos incluidos en esta subfamilia (quinolinas, quinoxalinas, piridinas y furopiridinas) son los más frecuentemente encontrados en la carne y el pescado cocinados, por tanto son los que contribuyen mayormente a la mutagenicidad de este tipo de alimentos. A partir del estudio de sistemas modelo, en 1983 Jägerstad y col. (Jägerstad *et al.*, 1983) propusieron que las quinolinas y las quinoxalinas se formaban durante el calentamiento de creati(ni)na, aminoácidos y azúcares reductores, lo que sugirió la participación de las reacciones de Maillard. El mecanismo sugerido se expone en la Figura 1.5: piridinas/pirazinas y aldehidos, generados en las reacciones de Maillard de azúcares y aminoácidos, se fusionan mediante una condensación aldólica con la creatinina, compuesto únicamente presente en tejidos animales. Dependiendo de la identidad del aminoácido, la quinolina o quinoxalina obtenida es diferente. Por ejemplo, en el caso de que la glicina reaccione con la hexosa, se formaría IQ o MeIQx, mientras que si el aminoácido es alanina, se obtendría MeIQ.

### Quinolinas

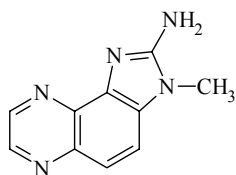


**IQ**

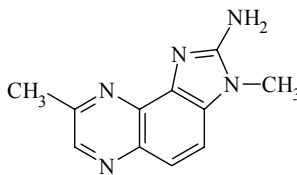


**MeIQ**

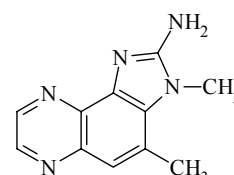
### Quinoxalinas



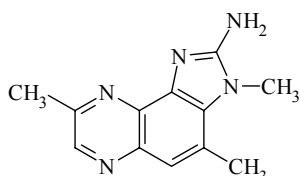
**IQx**



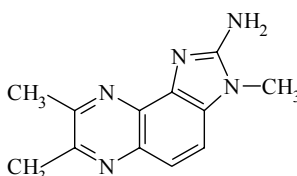
**8-MeIQx**



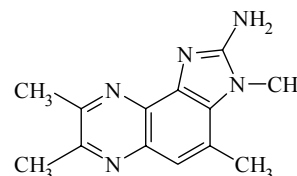
**4-MeIQx**



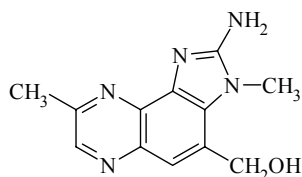
**4,8-DiMeIQx**



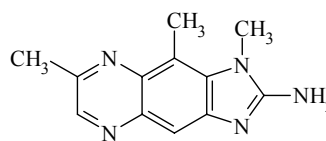
**7,8-DiMeIQx**



**4,7,8-TriMeIQx**

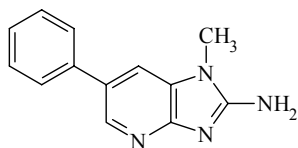


**4-CH<sub>2</sub>OH-8-MeIQx**

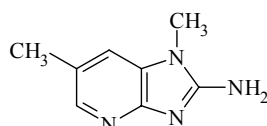


**7,9-DiMeIQx**

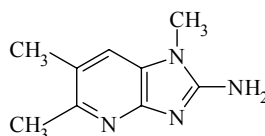
### Piridinas



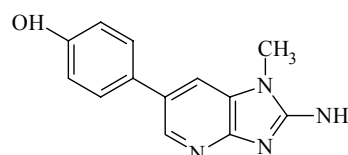
**PhIP**



**1,6-DMIP**

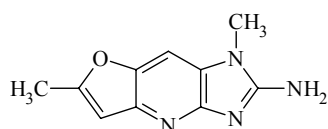


**1,5,6-TMIP**



**4'-OH-PhIP**

### Fuopiridinas



**IFP**

Figura 1.4.- Estructura de los aminoimidazoazaarenos o aminas térmicas.

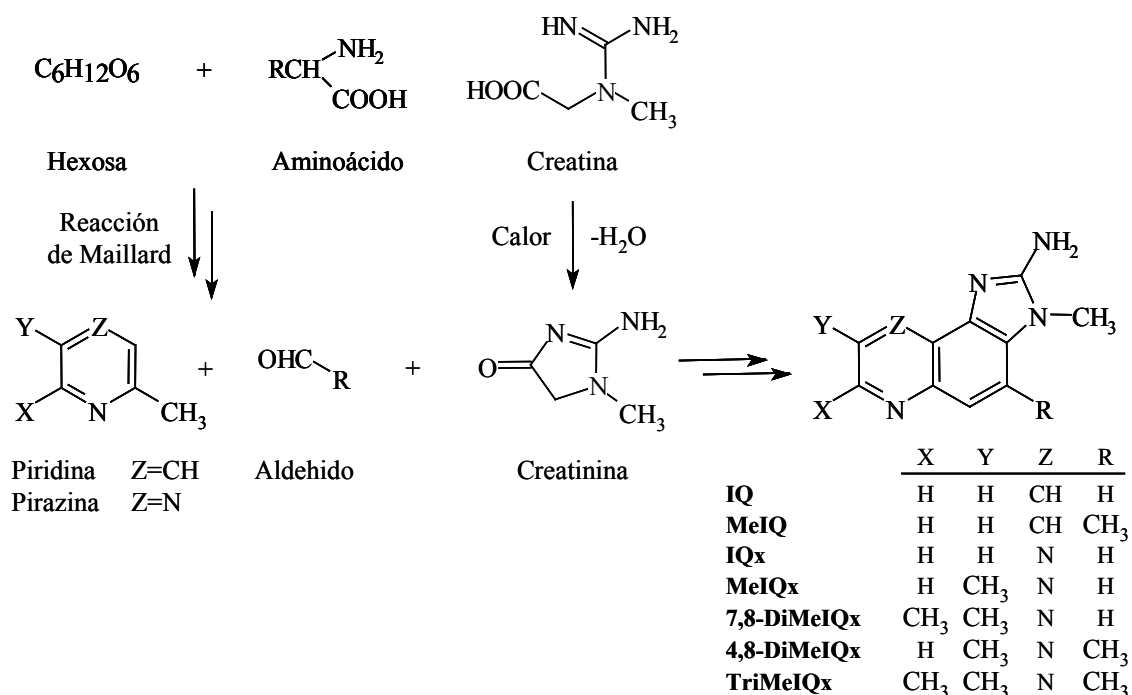


Figura 1.5.- Formación de quinolinas y quinoxalinas a partir de la reacción de Maillard de azúcares y aminoácidos, seguido de la fusión con creatinina.

Por su parte, parece ser que los AIAs de tipo piridínico no requieren la presencia de piridinas y pirazinas para su formación. Así, se ha postulado que la PhIP se origina por la condensación aldólica de fenilacetaldehído, producto de la degradación térmica de fenilalanina, con creatinina, tal y como se muestra en la Figura 1.6 (Zochling *et al.*, 2002).

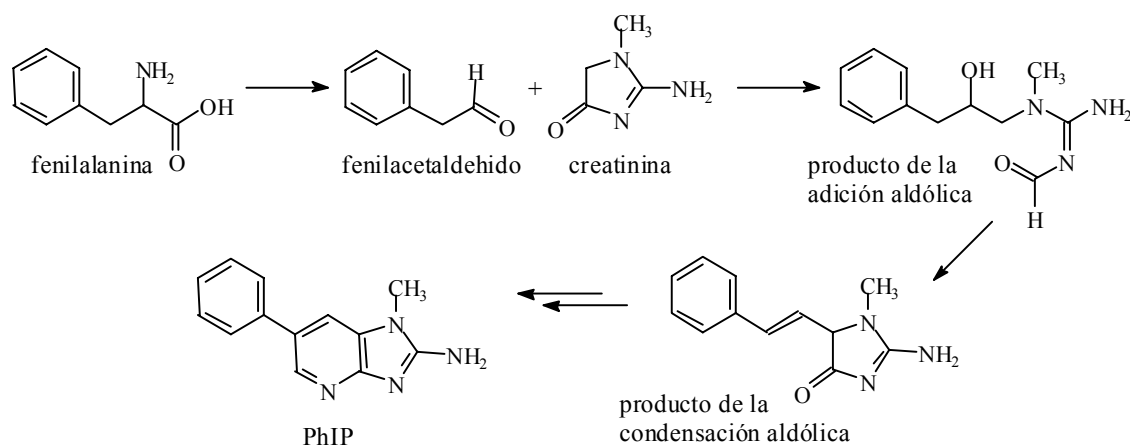


Figura 1.6.- Formación de la PhIP a partir de fenilalanina y creatinina.

### Factores que influyen en la generación de las HAs

Se han estudiado extensivamente cuáles son los factores que favorecen la generación de aminas mutagénicas durante el procesado térmico de la carne y el pescado, y se pueden encontrar en la bibliografía varios trabajos interesantes que los resumen (Skog, 1993; Jagerstad *et al.*, 1998; Skog *et al.*, 1998a). Se ha observado que la temperatura tiene una marcada influencia sobre la concentración de HAs en los alimentos. Así, a temperaturas inferiores a 160°C, generalmente no se detecta la presencia de mutágenos, y a partir de este valor la cantidad de HAs aumenta progresivamente a medida que aumenta la temperatura (Knize *et al.*, 1994; Skog *et al.*, 1995). Otro factor de gran influencia es la duración de la cocción, ya que cuanto más larga es, más elevado resulta ser el contenido de HAs. A modo de ejemplo, en la Figura 1.7 se muestra el contenido en MeIQx y PhIP, que son dos de las aminas mutagénicas más frecuentemente detectadas, en ternera cocinada a diferentes tiempos y temperaturas.

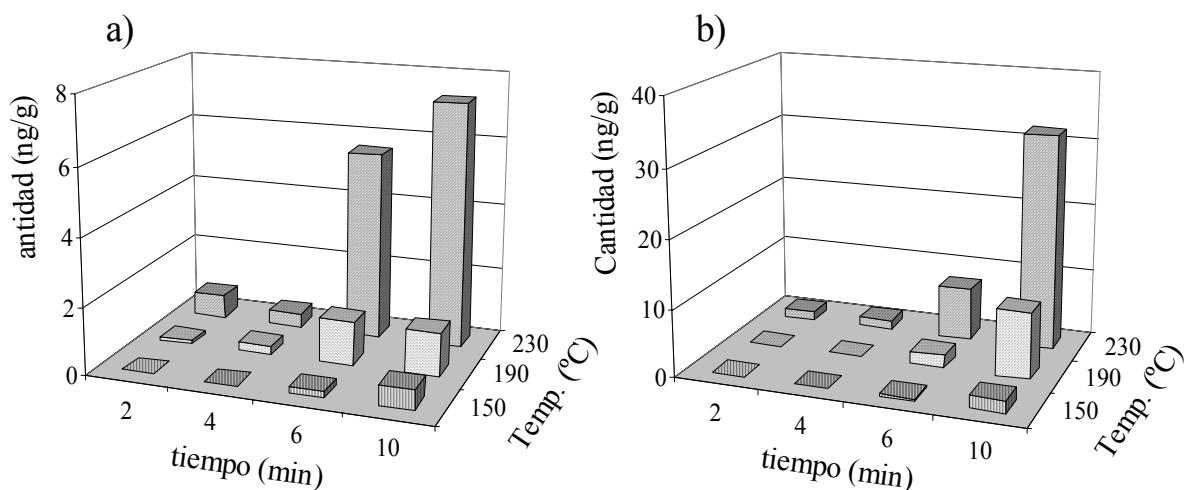


Figura 1.7.- Efecto del tiempo y la temperatura de procesado en la formación de a) MeIQx y b) PhIP. Los valores mostrados corresponden al promedio de cuatro medidas (Knize *et al.*, 1994).

Hay que destacar también la influencia del tipo de cocción, ya que la temperatura utilizada y el mecanismo de transmisión del calor son muy diferentes. En general, los tipos de cocinado que implican temperaturas alrededor de 100°C (hervir en agua, hacer al vapor, escalfar o hacer a la cazuela) no generan agentes mutagénicos o la cantidad es tan pequeña que no es cuantificable. Otros tipos de cocción que calientan los alimentos mediante convección indirecta, como es el caso del horno convencional, producen niveles bajos de



HAs, y con el uso de los hornos de microondas la cantidad de HAs formada es casi nula (Felton *et al.*, 1994). En cambio, numerosas publicaciones han demostrado que los procesos en los que se produce un contacto directo entre la fuente de calor y el alimento, como hacer a la brasa, freír o asar, son los que producen mayor nivel de mutágenos (Sinha *et al.*, 1998a; Sinha *et al.*, 1998b).

Otra opción para reducir la formación de HAs es el rebozado, que actúa como una capa aislante (Krone *et al.*, 1986), o el marinado con determinadas especias, como romero, mostaza, o zumo de limón entre muchos otros (Salmon *et al.*, 1997; Murkovic *et al.*, 1998). El efecto del marinado es atribuible a la presencia de compuestos antioxidantes, los cuales inhiben los procesos radicalarios. Esto se ha comprobado añadiendo previamente al procesado antioxidantes como la vitamina E o compuestos fenólicos, lo que resultó en una drástica disminución de la formación de mutágenos (Britt *et al.*, 1998; Oguri *et al.*, 1998; Balogh *et al.*, 2000).

Además, la cantidad de grasa desempeña un papel relevante, ya que hace más eficiente la transmisión del calor lo que provoca un aumento de la mutagenicidad (Johansson *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha observado también que el uso de aceite de oliva reduce la formación de HAs (Johansson *et al.*, 1995b; Monti *et al.*, 2001), posiblemente debido a la presencia de compuestos fenólicos inhibidores de la formación de radicales. Éstos no sólo intervienen en la formación de las aminas pirolíticas, sino que también se generan en las etapas iniciales de la reacción de Maillard.

Por otro lado, hay que señalar que la cantidad generada en diversos tipos de alimento es diferente aunque se hayan procesado de manera similar, lo que es debido a la diferente composición en aminoácidos, creatina y proteínas, que son los precursores de las HAs. Otro factor de influencia es el contenido en agua, ya que actúa como disolvente del medio de reacción. Sin embargo, un exceso de agua provoca la dilución de los precursores y por tanto dificulta la reacción.

#### Niveles de concentración de las HAs en alimentos

Los primeros datos cuantitativos de la presencia de HAs en alimentos fueron publicados a principios de la década de los 80. Desde entonces, han sido numerosos los trabajos enfocados a la determinación de las concentraciones de estos mutágenos. De entre las HAs conocidas, todas excepto TriMeIQx, Lys-P-1, Orn-P-1 y Cre-P-1 han sido detectadas a diferentes niveles en varios tipos de alimentos. Dada la gran variabilidad tanto

de las características del alimento procesado como de la metodología culinaria utilizada, las concentraciones de las HAs descritas en la bibliografía abarcan un amplio intervalo de valores, tal y como se aprecia en la Figura 1.8, donde se muestran los contenidos de varias HAs en ternera, cerdo, pollo y pescado. Se puede observar que, en general, el compuesto más abundante es la PhIP. En los demás casos, las aminas encontradas más frecuentemente y en mayor cantidad dependen del tipo de alimento.

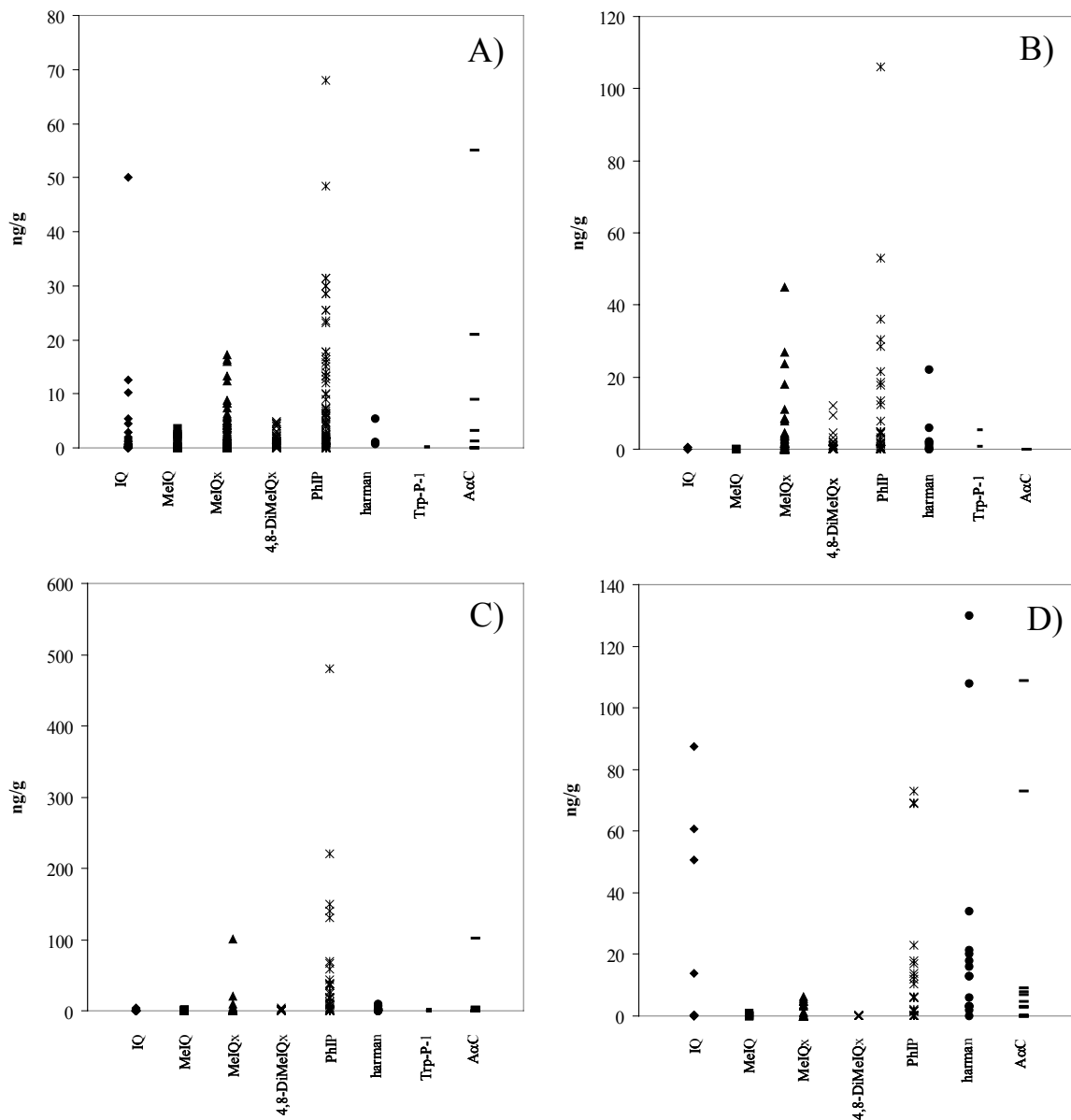


Figura 1.8.- Contenido en ng/g de algunas HAs en a) ternera, b) cerdo, c) pollo y d) pescado procesados térmicamente. Datos extraídos de los trabajos listados en la Tabla 1.5.

Así, en la ternera las HAs que se encuentran en mayor concentración son PhIP>A $\alpha$ C>MeIQx>IQ, mientras que en el caso del cerdo, destacan la presencia de PhIP y MeIQx, aunque también la 4,8-DiMeIQx y el comutágeno harman están presentes. En el pollo, la PhIP se forma a niveles considerables, seguido de cantidades respetables de MeIQx y A $\alpha$ C. En pescado se encuentran sobretodo harman>A $\alpha$ C>IQ>PhIP.

En la Tabla 1.5 se incluye un amplio listado de los trabajos bibliográficos que analizan HAs en carne y pescado cocinados y también en derivados como los aromas o los extractos de carne. En esta tabla se indican además las condiciones del procesado, cuando éstas han sido descritas en el trabajo, y los intervalos de concentración en los alimentos para IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP y A $\alpha$ C, ya que son las HAs más frecuentemente determinadas. Como se puede observar, en múltiples trabajos, sobretodo en los más antiguos, las condiciones no están descritas o el procesado del alimento se realizó en condiciones de tiempo y temperatura mucho más drásticas que las normales, con lo cual los niveles de concentración de los analitos eran más elevados (Barnes *et al.*, 1983b; Wakabayashi *et al.*, 1993; Sinha *et al.*, 1995a). Algunos trabajos se enfocan al estudio de la influencia en la generación de HAs de diversos factores como temperatura/tiempo (Felton *et al.*, 1994; Knize *et al.*, 1994; Skog *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 1995b; Abdulkarim *et al.*, 1998; Sinha *et al.*, 1998a; Sinha *et al.*, 1998b) y método de cocinado (Gross *et al.*, 1992; Sinha *et al.*, 1995a; Sinha *et al.*, 1998a; Sinha *et al.*, 1998b). Confirmando lo que se había comentado anteriormente, las concentraciones más elevadas se generan a temperaturas altas y con un tiempo de cocción prolongado. Además, la cantidad de HAs es mayor al cocinar a la brasa o a la parrilla (Knize *et al.*, 1997b; Knize *et al.*, 1998b), ya que en estos casos el contacto entre la fuente de calor y la superficie del alimento es directo. También se forman cantidades apreciables de mutágenos al freír (Gross *et al.*, 1993; Solyakov *et al.*, 2002), dado que la superficie de la sartén está a una elevada temperatura. En cambio, en los trabajos que utilizan un horno convencional (Skog *et al.*, 1997), uno de microondas (Chiu *et al.*, 1998) o hierven el alimento (Solyakov *et al.*, 2002) no se detecta ninguno de los compuestos o se encuentran a un bajo nivel de concentración. También se ha estudiado el contenido de HAs en alimentos comprados en restaurantes o similares, detectándose generalmente contenidos inferiores a los de muestras equivalente cocinadas en el laboratorio o en casas particulares (Knize *et al.*, 1995; Richling *et al.*, 1998; Knize *et al.*, 1998b). También se ha detectado la presencia de aminas en los residuos de la sartén en la que se ha frito el alimento, en unas concentraciones en algunos casos superiores a las del

propio alimento (Johansson *et al.*, 1995b). En algunas publicaciones científicas se pueden encontrar varias recopilaciones de los valores de concentración de las HAs en alimentos (Layton *et al.*, 1995; Skog *et al.*, 1998a; Pais *et al.*, 2000a; Skog *et al.*, 2002).

Tabla 1.5.- Contenido de algunas HAs en carne, pescado y derivados procesados.

Muestra	Condiciones de cocinado		Contenidos en carne, pescado y derivados (ng/g)					Ref.	
	T <sup>a</sup>	t	IQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	PhIP	AαC		
Hamburguesa de ternera	frita	240°C	5 min/cara	50					(Barnes <i>et al.</i> , 1983b)
Hamburguesa de ternera (residuo sartén)	frita	200°C	5/3 min		1,2-1,6 (2,1-4,3)	0,2-0,4 (0,5-1,1)	1,0-1,1 (2,0-13,3)		(Johansson <i>et al.</i> , 1995b)
Hamburguesa de ternera	frita	180°C	3-10 min/cara		0,34-4,3		n.d.-2,3		(Sinha <i>et al.</i> , 1998b)
Hamburguesa	frita								(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
Hamburguesa	frita			n.d.	1,3		0,3		(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
Hamburguesa	parrilla	comercial			1,3-1,8	n.d.-0,1	1,9-4,4		(Knize <i>et al.</i> , 1998b)
Hamburguesa de ternera	parrilla				3,36		17,8		(Murray <i>et al.</i> , 2001)
Hamburguesa de ternera	parrilla	185°C	6-12 min		n.d.-1,6		n.d.		(Sinha <i>et al.</i> , 1998b)
Hamburguesa	parrilla								(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
Hamburguesa	brasa	comercial			0,2-1,8	n.d.	1,8-18,4		(Knize <i>et al.</i> , 1998b)
Hamburguesa de ternera	brasa	210°C	9-38 min		n.d.-4,6		n.d.-16,8		(Sinha <i>et al.</i> , 1998b)
Hamburguesa		comercial			n.d.-0,3	n.d.-0,1	0,1-0,6		(Knize <i>et al.</i> , 1995)
hamburguesa		comercial			0,4	n.d.	0,3		(Richling <i>et al.</i> , 1998)
Hamburguesa		comercial			0,4	n.d.			(Richling <i>et al.</i> , 1999)
Hamburguesa					0,89-16,4	n.d.-4,5	11-67,5		(Knize <i>et al.</i> , 1997a)
Ternera	frita	275°C	5-15 min	0,3-1,9	2,7-12,3	n.d.-3,9			(Turesky <i>et al.</i> , 1988)
Ternera	frita			n.d.	1,1	n.d.	1,2		(Gross <i>et al.</i> , 1989)
Ternera	frita	190°C	3 min/cara		5,1-8,3	1,3-2	23,5-48,5	3,2-8,9	(Gross, 1990)
Ternera	frita				2,2	0,7	16,4		(Murray <i>et al.</i> , 1993)
Ternera	frita			n.d.	0,64	0,12	0,56	n.d.	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
Ternera	frita	200-250°C	6 min/cara	n.d.-1,0	3,0-5,1	0,3-1,2	2,7-13,3		(Felton <i>et al.</i> , 1994)
Ternera	frita	277°C	6 min/cara		16,4	4,5	1,47	21,0	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1994)
Ternera	frita	190-250°C	2-10 min/cara	n.d.-0,7	n.d.-7,3	n.d.-1,2	0-9,8		(Knize <i>et al.</i> , 1994)
Ternera (residuo sartén)	frita	150-225°C	1-3,5 min/cara		n.d.-6,2 (0,07-23,3)	n.d.-2,7 (n.d.-4,1)	0,02-12,7 (0,1-82,4)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Ternera picada (residuo sartén)	frita	150-225°C	5-7 min		n.d.-2,2 (0,06-5,8)	n.d.-0,8 (0,02-1,1)	0,01-1,1 (0,08-11,2)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Ternera	frita	200-280°C			4,3-16	1,3-4,5	4,9-68	0-21	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1995)
Ternera	frita	150-230°C	7,5-15 min/cara		n.d.-1,16		0,15-1,70		(Abdulkarim <i>et al.</i> , 1998)
Ternera	frita		7 min/cara	2,0-12,5	5,0-8,7	1,8-4,1			(Mardones <i>et al.</i> , 1998)
Ternera	frita	180°C	3-10 min/cara		1,3-8,2		1,9-23,2		(Sinha <i>et al.</i> , 1998b)

Tenera	frita	200°C			n.d.-3,80	n.d.-0,80	0,29-7,33		(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
Tenera	frita	175-225°C	6 min/cara	0,7-2,8	0,5-3,5	0,8-3,0	0,9-13,3		(Balogh <i>et al.</i> , 2000)
Tenera	frita	200°C	3,5-15 min	n.d.	2,3-17,3	n.d.-2,2	0,9-28,5		(Heddle <i>et al.</i> , 2001)
Tenera	frita			n.d.	1,2	n.d.	4,3		(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
Tenera	parrilla	260°C	3-7 min/cara		0,8-2,0	n.d.	0,7-3,1	n.d.	(Gross <i>et al.</i> , 1993)
Tenera	parrilla			0,19	2,11	n.d.	15,7	1,20	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
Tenera	parrilla				6	1,2	14		(Fay <i>et al.</i> , 1997)
Tenera	parrilla	100°C			0,5		30	55	(Knize <i>et al.</i> , 1997b)
Tenera	parrilla	comercial			1,7-2,4	n.d.-0,4	6,8-9,0		(Knize <i>et al.</i> , 1998b)
Tenera	parrilla								(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
Tenera	parrilla	185°C	6-12 min		n.d.-1,7		2,1-7,1		(Sinha <i>et al.</i> , 1998b)
Tenera	brasa	comercial			1,1-1,6	n.d.	5,7-15		(Knize <i>et al.</i> , 1998b)
Tenera	brasa	210°C	9-38 min		0,2-2,7		2,5-30,0		(Sinha <i>et al.</i> , 1998b)
Tenera	brasa			n.d.	0,7	n.d.	n.d.		(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
Tenera	horno	275°C	30 min		1,43	0,2	1,2		(Pais <i>et al.</i> , 1999)
Carnero	parrilla			n.d.	1,01	0,67	42,5	2,50	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
Buey asado		comercial			5,2	0,4	0,6		(Richling <i>et al.</i> , 1998)
Buey asado		comercial			5,2	0,4			(Richling <i>et al.</i> , 1999)
Pollo sin piel	frito	200°C	7-18 min/cara		1-3	1-4	12-70		(Sinha <i>et al.</i> , 1995a)
Pollo con piel	frito	190°C	10 min/cara		n.d.	n.d.	25		(Sinha <i>et al.</i> , 1995a)
Pollo	frito	140°C		1,1	1,4	0,4	3,8		(Murkovic <i>et al.</i> , 1997)
Pollo	frito	175-225°C			0,4-0,5	0,2-0,5	0,5-10		(Skog <i>et al.</i> , 1997)
Pollo	frito	100-200°C	15 min	0,13-0,51	0,08-0,91	n.d.-0,78	0,14-0,97	0-0,23	(Chiu <i>et al.</i> , 1998)
Pollo	frito	200°C	5-15 min	0,22-0,51	n.d.-0,91	n.d.-0,78	n.d.-2,81	n.d.-0,23	(Chiu <i>et al.</i> , 1998)
Pollo	frito	200°C			0,11-2,27	n.d.-2,26	0,20-17,54		(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
Pollo	frito	200°C	4 min	n.d.	2,0-2,3	1,2-2,0	18,2-18,6		(Heddle <i>et al.</i> , 2001)
Pollo	frito			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
Pollo	frito	190°C	30 min		0,3-1,8	0,3-0,4	12,2-38,2		(Solyakov <i>et al.</i> , 2002)
Pollo	parrilla			n.d.	2,33	0,81	38,1	0,21	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
Pollo		comercial			n.d.	n.d.	n.d.		(Knize <i>et al.</i> , 1995)
Pollo sin piel	parrilla	100°C	9-17 min		n.d.-3	n.d.	6-150		(Sinha <i>et al.</i> , 1995a)
Pollo con piel	parrilla	180°C	15 min		n.d.	n.d.	131		(Sinha <i>et al.</i> , 1995a)
Pollo	parrilla	220°C	40 min		0,11	0,10-0,15	1,4-7,6		(Tikkanen <i>et al.</i> , 1996)
Pollo sin piel	parrilla		2-6 min	0,5-3,7	5,3-101		9,4-43,1	3,5-102	(Holder <i>et al.</i> , 1997)
Pollo	parrilla	100°C			0,2		58	n.d.	(Knize <i>et al.</i> , 1997b)
Pollo	parrilla	comercial			2,2	1,3	1,6		(Richling <i>et al.</i> , 1998)
Pollo	parrilla	comercial			2,2	1,3			(Richling <i>et al.</i> , 1999)

Pollo	brasa				0,3	0,1	int.		(Murray <i>et al.</i> , 1993)
Pollo sin piel	brasa	200°C	10-40 min		n.d.-9	n.d.-2	27-480		(Knize <i>et al.</i> , 1995)
Pollo con piel	brasa	191°C	20 min		n.d.	n.d.	36		(Knize <i>et al.</i> , 1995)
Pollo	brasa				n.d.-2,3	n.d.-1,0	n.d.-0,8		(Solyakov <i>et al.</i> , 2002)
Pollo	horno	150-200°C			n.d.	n.d.	0,04-0,3		(Skog <i>et al.</i> , 1997)
Pollo	horno	275°C	30 min		0,02-0,5	0,05-0,2	8,0-37,5		(Pais <i>et al.</i> , 1999)
Pollo	horno	200°C	30 min		n.d.-1,7	n.d.-0,3	n.d.-3,0		(Solyakov <i>et al.</i> , 2002)
Pollo	micro-ondas		5-15 min	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,1-0,14	(Chiu <i>et al.</i> , 1998)
Pollo	hervido	100°C	240 min		n.d.	n.d.	n.d.		(Solyakov <i>et al.</i> , 2002)
Pavo	horno	275°C	30 min		1,0	0,19	6,8		(Pais <i>et al.</i> , 1999)
Cerdo (residuo sartén)	frito	150-225°C	2-6 min/cara		n.d.-2,6 (n.d.-1,9)	n.d. 1,1 (n.d.-0,5)	n.d.-4,8 (n.d.-3,8)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Residuo sartén de freír cerdo		250°C	10 min	0,014	1,0	0,51			(Olsson <i>et al.</i> , 1997)
Cerdo	frito	150-225°C			n.d.-4,6	n.d.-3,3	n.d.-13,4		(Skog <i>et al.</i> , 1997)
Cerdo (chuleta)	frita	punto-muy hecho			n.d.-3,8		n.d.		(Sinha <i>et al.</i> , 1998a)
Cerdo	frito	225°C						n.d.	(Skog <i>et al.</i> , 1998b)
Cerdo	frito	200°C			0,25-2,22	0,10-0,95	0,37-7,82		(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
Cerdo	frito	200°C	5 min	n.d.	7,7-8,5	2,0-2,2	17,7-21,5		(Heddle <i>et al.</i> , 2001)
Cerdo	frito			n.d.	1,8	0,6	1,7		(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
Cerdo	parrilla	comercial			1,6	0,3			(Richling <i>et al.</i> , 1999)
Cerdo	horno	275°C	30 min		3,5	0,4	4,7		(Pais <i>et al.</i> , 1999)
Cerdo					0,4	0,1	4,2		(Murray <i>et al.</i> , 1993)
Bacon	frito	170°C	12 min		0,9-18	n.d.-1	n.d.-53	n.d.	(Gross <i>et al.</i> , 1993)
Bacon	frito				1,2	0,3	2,7		(Murray <i>et al.</i> , 1993)
Bacon (residuo sartén)	frito	150-225°C	2-4 min/cara		n.d.- 23,7 (n.d.-0,9)	0,2-1,4 (n.d.)	0,3-4,5 (0,06-0,8)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Bacon	frito	200°C			45	12	106	n.d.	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1995)
Bacon	frito				1,0-27	n.d.-9,3	n.d.-36		(Knize <i>et al.</i> , 1997a)
Bacon	frito	Punto-muy hecho			0,4-4,3		n.d.-4,8		(Sinha <i>et al.</i> , 1998a)
Bacon	frito	200°C			0,22-3,79	n.d.	0,11-1,93		(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
Bacon	parrilla			0,42-0,53	1,61-8,41	0,94-4,51	4,97-28,4		(Guy <i>et al.</i> , 2000)
Bacon	horno	Punto-muy hecho			n.d.-4		1,4-30,3		(Sinha <i>et al.</i> , 1998a)
Bacon	micro-ondas	Punto-muy hecho			n.d.-1,5		n.d.-3,1		(Sinha <i>et al.</i> , 1998a)
Panceta de cerdo (residuo sartén)	frita	150-225°C	2-4 min/cara		n.d.- 2,9 (n.d.-0,9)	n.d.-0,7 (n.d.-0,2)	0,02-12,4 (0,04-4,0)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Salchicha	frita	150-225°C	2 min/cara		n.d. (0,03-0,2)	n.d.-0,07 (0,04-0,1)	n.d.-0,1 (0,06-0,4)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Salchicha	frita				1,8	1,9	n.d.		(Fay <i>et al.</i> , 1997)
Salchicha de cerdo	frita	150/230°C	3-7,5 min/cara		n.d.-0,92		n.d.-0,08		(Abdulkarim <i>et al.</i> , 1998)

Salchicha	frita	Punto-muy hecho			n.d.-1,3		n.d.-0,1		(Sinha <i>et al.</i> , 1998a)
Salchicha	frita	200°C			0,07-0,36	n.d.	n.d.-0,61		(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
Salchicha de cerdo	brasa	200-240°C	3,5-6 min/cara		n.d.-1,97		0,09-1,89		(Abdulkarim <i>et al.</i> , 1998)
Salchicha		comercial			n.d.-0,3	n.d.	n.d.		(Knize <i>et al.</i> , 1995)
Albóndigas (Residuo sartén)	fritas	150-225°C	6,5-9 min		n.d.-0,8 (0,02-0,7)	n.d.-0,3 (0,02-0,1)	n.d.-0,1 (0,03-0,5)		(Skog <i>et al.</i> , 1995)
Cordero (chuleta)	frita	150-225°C			n.d.-0,4	n.d.-0,6	n.d.-1,5		(Skog <i>et al.</i> , 1997)
Cordero	frito	200°C			0,4-1,0	n.d.	n.d.-2,4		(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
Cordero	frito	200°C	5,5 min	n.d.	5,2-7,7	3,3-3,4	9,4-27,4		(Heddle <i>et al.</i> , 2001)
Extracto de ternera				0,2	3,1				(Takahashi <i>et al.</i> , 1985)
Extracto de ternera				n.d.-5,6	11,7-29,2	0-3,2			(Turesky <i>et al.</i> , 1988)
Extracto de ternera				n.d.-10	8,5-23	n.d.-1,1	n.d.		(Gross <i>et al.</i> , 1989)
Extracto de ternera					n.d.-44	n.d.-4,9	n.d.	n.d.	(Gross, 1990)
Extracto de ternera					5,1				(Galceran <i>et al.</i> , 1993)
Extracto de ternera					0,6	n.d.	n.d.		(Murray <i>et al.</i> , 1993)
Extracto de ternera				n.d.	3,10	n.d.	3,62	n.d.	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
Extracto de ternera				15					(Galceran <i>et al.</i> , 1996a)
Extracto de ternera								2,8	(Pais <i>et al.</i> , 1997a)
Extracto de ternera									(Pais <i>et al.</i> , 1997b)
Extracto de carne	micro-ondas				46,0	6,2	7,5		(Fay <i>et al.</i> , 1997)
Extracto de carne	liofilizado				29,0	4,8	n.d.		(Fay <i>et al.</i> , 1997)
Extracto de carne				n.d.	n.d.	n.d.			(Mardones <i>et al.</i> , 1998)
Extracto de carne								n.d.-8,1	(Skog <i>et al.</i> , 1998b)
Extracto de carne				0,11-4,76	0,92-45,51	0,18-13,65	0,09-5,97		(Guy <i>et al.</i> , 2000)
Aroma de ternera					n.d.-21,2	n.d.-4,2			(Jackson <i>et al.</i> , 1994)
Aroma de carne				2,1-9,6					(Stavric <i>et al.</i> , 1997b)
Aroma de carne					8,9-12,3	1,0-1,5			(Richling <i>et al.</i> , 1999)
Aroma de carne				n.d.-3,4	n.d.-13,8	n.d.-2,9	n.d.	n.d.-0,4	(Solyakov <i>et al.</i> , 1999)
Concentrado de caldo				n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	(Solyakov <i>et al.</i> , 1999)
Concentrado de caldo				n.d.-0,7	0,3-0,9	n.d.-2,3			(Krach <i>et al.</i> , 2000)
Embutidos				n.d.	n.d.		n.d.		(Stavric <i>et al.</i> , 1997a)
Huevo	frito	225°C		0,2					(Grose <i>et al.</i> , 1986)
Salmón	parrilla			0,2-0,4					(Edmons <i>et al.</i> , 1986)
Salmón	parrilla	200°C	3-12 min/cara		1,4-5		1,7-23	n.d.-9	(Gross <i>et al.</i> , 1992)
Salmón	horno	200°C	20-40 min		n.d.-4,6		n.d.-18	n.d.	(Gross <i>et al.</i> , 1992)
Salmón	brasa	270°C	4-12 min/cara		n.d.		2-73	2,8-109	(Gross <i>et al.</i> , 1992)
Salmón	horno		30 min	n.d.	n.d.	n.d.			(Mardones <i>et al.</i> , 1998)

Bacalao	frito			0,16	6,44	0,10	69,2	n.d.	(Wakabayashi <i>et al.</i> , 1993)
Bacalao	rebozado y frito	150-225°C			n.d.-0,9	n.d.	0,02-2,2		(Skog <i>et al.</i> , 1997)
Bacalao	horno	275°C	30 min		n.d.	n.d.	3,2		(Pais <i>et al.</i> , 1999)
Pescado		comercial			n.d.	n.d.	n.d.		(Knize <i>et al.</i> , 1995)
Otak-otak (pescado)		comercial		14-87,5			1,6-11,8		(Wu <i>et al.</i> , 1996)
Arenque	rebozado y frito	150-225°C			n.d.-0,2	n.d.	0,06-0,3		(Skog <i>et al.</i> , 1997)
Pescado	frito	200°C	4 min	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		(Heddle <i>et al.</i> , 2001)
Caballa	frita	180°C	7-19 min/cara		0,01-5,8	n.d.-0,5	0,03-12,8	n.d.-3,1	(Gu <i>et al.</i> , 2002)

Hay que señalar que las HAs no han sido únicamente detectadas en alimentos proteicos procesados térmicamente, sino que también se han encontrado en algunas matrices medioambientales (Kataoka, 1997), tal y como se muestra en la Tabla 1.6. Así, se ha detectado la presencia de varias HAs en el humo desprendido al cocinar ternera y bacon (Thiebaut *et al.*, 1994; Thiebaut *et al.*, 1995), siendo posible la cuantificación de MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP y A $\alpha$ C a niveles de concentración entre 0,006 y 1,8 ng por gramo carne frito. También se ha analizado el humo de tabaco (Yamashita *et al.*, 1986; Kanai *et al.*, 1990; Manabe *et al.*, 1990; Manabe *et al.*, 1991; Bross *et al.*, 1997; Kataoka *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 2001), cuantificándose cantidades de entre 0,26-2,18 ng/cigarrillo de IQ, 1,48-23 ng/cigarrillo de PhIP y 6,51-47,83 ng/cigarrillo A $\alpha$ C entre otros. Además, se ha detectado PhIP en partículas atmosféricas a un nivel de 2,54 pg/m<sup>3</sup> (Manabe *et al.*, 1993a), y en agua de lluvia a una concentración de 84,65 ng/L (Wu *et al.*, 1995). La presencia de HAs en este tipo de muestras hace pensar que posiblemente estos mutágenos entran en la atmósfera a partir de la combustión de materiales, y que son arrastrados por el agua de lluvia o bien se adsorben en el material particulado. También se han encontrado HAs en agua de río (Ohe, 1997; Kataoka *et al.*, 2000), posiblemente provenientes del agua de lluvia o bien de residuos biológicos humanos. Sorprendentemente, también se ha detectado también la presencia de HAs en vino y cerveza (Manabe *et al.*, 1993b; Richling *et al.*, 1997), posiblemente originadas en el proceso de fermentación.



Tabla 1.6.- Contenidos en otras matrices

Muestra	IQ	MeIQ	MeIQx	4,8-DiMeIQx	PhIP	Glu-P-1	Trp-P-1	A $\alpha$ C	Unid.	Ref.
Humo de freír ternera			0,971	0,147	1,47			3,48	ng/g	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1994)
Humo de freír ternera			0,14-1,1	0,006-0,25	0,14			0,084	ng/g	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1995)
Humo de freír bacon			n.d.	n.d.	1,0			2,0	ng/g	(Thiebaud <i>et al.</i> , 1995)
Humo de tabaco	0,26								ng/cig.	(Yamashita <i>et al.</i> , 1986)
Humo de tabaco						0,37-0,89			ng/cig.	(Kanai <i>et al.</i> , 1990)
Humo de tabaco							0,29-0,48	27,7-47,83	ng/cig.	(Manabe <i>et al.</i> , 1990)
Humo de tabaco					11-23				ng/cig.	(Manabe <i>et al.</i> , 1991)
Humo de tabaco					20,3				ng/cig.	(Bross <i>et al.</i> , 1997)
Humo de tabaco	0,65-0,94	0,73-1,00	n.d.	n.d.	1,48-2,09	n.d.	0,60-1,11	6,51-6,96	ng/g	(Kataoka <i>et al.</i> , 1998)
Humo de tabaco	2,18				3,73	n.d.			ng/cig.	(Sasaki <i>et al.</i> , 2001)
Partículas atmosféricas					2,54				pg/m <sup>3</sup>	(Manabe <i>et al.</i> , 1993a)
Agua de lluvia				16,83	84,65				ng/L	(Wu <i>et al.</i> , 1995)
Vino	n.d.-10	n.d.	n.d.		n.d.-83	n.d.				(Richling <i>et al.</i> , 1997)

### Evaluación del riesgo

Uno de los factores clave en el establecimiento de la relación entre la exposición a las HAs y la aparición de enfermedades es el cálculo de la ingesta diaria. Evidentemente, este parámetro depende de los métodos de cocinado, de los tipos y cantidades de alimento consumido y del grado de cocción (Augustsson *et al.*, 1997). Es por ello que la realización de encuestas relacionadas con la frecuencia de consumo de determinados platos y del modo de cocinado de los mismos es primordial (Layton *et al.*, 1995; Skog *et al.*, 1995; Zimmerli *et al.*, 2001), ya que la información obtenida se puede combinar con los datos bibliográficos de cantidades de HAs en los alimentos. Esto ha permitido una estimación del valor de ingesta diaria, el cual oscila entre 0 y 7,1 ng/kg/día para cada uno de los compuestos (Layton *et al.*, 1995). Aunque el valor no es excesivamente alto, las HAs presentan un efecto sinérgico (Hasegawa *et al.*, 1996), y por tanto las consecuencias reales derivadas del consumo de estos mutágenos en la dieta son difíciles de evaluar.

El estudio de la relación entre la dieta y el cáncer se ha llevado a cabo mediante estudios epidemiológicos. En algunos, la correlación entre el consumo de carne y pescado procesados y el incremento de riesgo de padecer cáncer no se ha establecido claramente, más bien se han atribuido las propiedades cancerígenas a otras sustancias como la grasa (Oreggia *et al.*, 2001). En cambio, la consideración del método de cocinado y del grado de cocción ha permitido la obtención de una correlación más clara, demostrándose que el consumo de carne muy hecha conlleva un mayor riesgo de padecer algún tipo de tumor, sobretodo colorectal y de mama (Sinha *et al.*, 1999; Norat *et al.*, 2001; Norat *et al.*, 2002).

Sin embargo, el riesgo humano asociado con el consumo de HAs no sólo depende de la ingesta de cada mutágeno, sino también de la potencia cancerígena de cada uno de ellos (Felton *et al.*, 1997). Además, los diferentes polimorfismos enzimáticos, originados por factores ambientales o genéticos, derivan en variaciones de las rutas metabólicas seguidas en el organismo (Kadlubar *et al.*, 1992). Como consecuencia, la susceptibilidad individual a la carcinogénesis química es altamente variable, lo que sugiere la necesidad de investigar biomarcadores como medidores del nivel de exposición a las HAs y de susceptibilidad genética del individuo (Strickland *et al.*, 1995; Alexander *et al.*, 2002).

## 1.2. ANÁLISIS DE LAS AMINAS HETEROCÍCLICAS

El descubrimiento de las aminas heterocíclicas en alimentos y los indicios que sugieren una estrecha relación con algunos tipos de cáncer han conllevado la necesidad de cuantificar esta familia de compuestos. Sin embargo, hay varios factores que dificultan la determinación fiable de las HAs en alimentos, entre ellos la elevada complejidad de la matriz y el bajo nivel de concentración al que se encuentran los analitos. Todo ello hace imprescindible el desarrollo de metodología analítica, tanto de tratamiento de muestra como de determinación.

### 1.2.1. Métodos de tratamiento de muestra

Las aminas heterocíclicas han sido analizadas en una extensa gama de muestras, principalmente tejidos animales procesados térmicamente así como muestras alimentarias de origen industrial como los concentrados de caldo, los aromas o los extractos de carne. También se han analizado sistemas modelo que simulan la formación de las HAs mediante el tratamiento térmico de sustancias presuntamente involucradas en la generación de estos mutágenos. Como se comentó con anterioridad, las HAs han sido también detectadas en muestras medioambientales, tales como partículas atmosféricas, humo de tabaco o agua de río y lluvia. Por otro lado, el establecimiento de las principales rutas metabólicas de las HAs, tanto de activación como de detoxificación, implican el estudio de fluidos biológicos. Además, el creciente interés en la búsqueda de biomarcadores ha provocado un aumento de las publicaciones que tienen como objetivo el análisis de este tipo de muestras.

El origen de la muestra condiciona en gran manera el grado de limpieza requerido, y por lo tanto la complejidad del tratamiento de muestra a aplicar. Esta etapa del proceso analítico implica en general cuatro etapas, las cuales a su vez pueden comprender varios procesos. En primer lugar, se requiere una homogeneización de la muestra, que haga posible una toma de muestra representativa. Este primer paso es frecuentemente suprimido en el caso de algunas muestras líquidas, como bebidas, orina o agua. A continuación, los analitos deben ser extraídos de la muestra, lo que supone una ruptura de las interacciones de las HAs con los macrocomponentes de la matriz seguido de una separación física de ambos. Una vez se consigue obtener un extracto crudo que contiene los contaminantes de interés, debe llevarse a cabo una etapa de purificación, en la cual se intenta eliminar el

mayor número de interferencias posible sin sacrificar la cantidad de analito. Finalmente, la concentración de las HAs en el extracto limpio debe ser modificada para adecuarse a la técnica de análisis que se va a emplear. Seguidamente, se resumen los métodos de tratamiento de muestra descritos en la bibliografía para los diferentes tipos de muestra analizados.

#### 1.2.1.1. Matrices alimentarias y sistemas modelo

Las referencias bibliográficas relacionadas con el análisis de HAs en alimentos se han subdividido en dos apartados. El primero consiste en una recopilación publicada por nosotros (Artículo I: Separation of heteroaromatic amines in food products) en el año 2000, y en el segundo se recogen los trabajos publicados desde entonces hasta la actualidad.

En el artículo I y tras una breve introducción que explica la problemática del análisis de las HAs en matrices alimentarias, se recogen los diferentes trabajos científicos publicados hasta aquel momento. Hay que señalar que las primeras publicaciones tenían como objetivo el aislamiento y caracterización de las sustancias mutagénicas detectadas en carne y pescado procesados. Posteriormente, y una vez conseguido este objetivo, la disposición de estándares hizo posible el desarrollo de procedimientos de purificación a escala analítica, que a su vez permitieron determinar las cantidades de HAs presentes en las muestras. Tras adicionar diferentes disolventes y realizar una homogeneización, los analitos se extraen normalmente mediante una extracción líquido-líquido (LLE), y el extracto obtenido se somete a una o varias etapas de purificación que utilizan a su vez LLE o bien adsorbentes. El método desarrollado en 1990 por Gian Gross (Gross, 1990), basado en el acoplamiento en tándem de la LLE con la extracción en fase sólida (SPE), fue todo un éxito, ya que reducía el número de etapas de decantación, evaporación y transferencia. Esto no sólo es beneficioso para la complejidad de proceso, sino también para la cantidad de analito recuperada. Este método ha sido modificado posteriormente, pero sigue siendo la base de los procedimientos que se utilizan hoy en día.

**- Artículo I**

*Separation of heteroaromatic amines in food products.*

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

*Journal of Chromatography B*, 747 (2000) 171-202.











































































## - Información adicional

En la Tabla 1.7 se recogen los trabajos publicados con posterioridad a la escritura de la recopilación anteriormente presentada. En la primera parte de dicha tabla, se incluyen las publicaciones que realizan alguna etapa aislada de extracción líquido sólido (LSE), bien utilizando columnas cromatográficas analíticas, columnas pequeñas rellenas con algún adsorbente o cartuchos comerciales de SPE. En estos casos, la etapa inicial de homogeneización de la muestra tiene lugar tras la adición de HCl (Kataoka *et al.*, 1999; Totsuka *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2002; Zochling *et al.*, 2002) o de mezclas de NaOH/MeOH (Vollenbroker *et al.*, 2000). En los dos primeros trabajos y en el último, el proceso continúa con una neutralización, seguido de la adición de rayón azul (Kataoka *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2002) o algodón azul (Totsuka *et al.*, 1999), unos adsorbentes consistentes en un pigmento (ftalocianinatrisulfonato de cobre) enlazado covalentemente a un polímero como el algodón o el rayón. Gracias a las partes hidrofóbicas del pigmento, la interacción con el núcleo aromático de las HAs es altamente selectiva. Las HAs se eluyen con una mezcla hidroorgánica que posteriormente se evapora, y el residuo se redisuelve con el disolvente adecuado. A continuación, se realiza una etapa de microextracción en fase sólida (SPME) (Kataoka *et al.*, 1999) o un fraccionamiento utilizando cromatografía de líquidos (Totsuka *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2002). En los otros dos trabajos, el homogeneizado de la muestra se pasa por un cartucho de SPE directamente (Zochling *et al.*, 2002) o tras ser centrifugado (Vollenbroker *et al.*, 2000). Finalmente, el extracto obtenido se evapora y redisuelve en el disolvente adecuado para la inyección en el sistema cromatográfico.

En la segunda parte de la tabla se incluyen los trabajos basados en modificaciones del procedimiento inicialmente publicado por Gross (Gross, 1990), que como ya se comentó anteriormente se basa en el acoplamiento directo de la LLE con la SPE y con el que es posible únicamente analizar las HAs polares. El tratamiento comienza con una dispersión de la muestra en medio alcalino, mezcla que se pone en contacto seguidamente con tierra de diatomeas, que actúa como un soporte sólido para la LLE. Los analitos son eluidos con diclorometano directamente a un cartucho de SPE relleno de partículas de base sílice con grupos propilsulfonato (PRS) unidos, lo cual confiere al adsorbente propiedades de intercambiador catiónico. Seguidamente, tras un lavado del cartucho PRS con disoluciones ácidas, las HAs se transfieren con acetato de amonio a un menos selectivo cartucho de C18. Para acabar, los analitos se eluyen de este último cartucho con un pequeño volumen

de una mezcla metanol/amoniaco, que se evapora a sequedad para permitir la redisolución del residuo en un mínimo volumen de metanol.

Muchos de los trabajos siguen fielmente el procedimiento, con pequeñas modificaciones en el disolvente de extracción de la tierra de diatomeas, en la concentración de HCl de las disoluciones de lavado del cartucho PRS o el disolvente del extracto final (Skog *et al.*, 2000; Pais *et al.*, 2000b; Borgen *et al.*, 2001; Monti *et al.*, 2001; Solyakov *et al.*, 2002). En algunos casos, las muestras más complejas se someten a una etapa adicional de purificación con otro cartucho de SPE (Skog *et al.*, 2000; Borgen *et al.*, 2001; Solyakov *et al.*, 2002) que contiene un relleno con grupos carboxilo (CBA) que actúan como un intercambiador catiónico débil. En el propuesto por nosotros (Toribio *et al.*, 2000b), el intercambio catiónico en el cartucho PRS se activa previamente al paso de los analitos, con lo que se consigue mantener retenidos en el adsorbente todas las HAs. Este procedimiento forma parte del trabajo experimental de esta memoria, por lo que se comentará con mayor detalle en el Capítulo 2.

En los dos casos restantes, las modificaciones son más drásticas. Así, Krach y colaboradores (Krach *et al.*, 2000) homogeneizan la muestra en medio ácido, y tras una centrifugación la mezclan con la tierra de diatomeas después de cambiar el pH a medio básico. Tras lavar el cartucho PRS con HCl 0,1 M y H<sub>2</sub>O, eluyen los analitos directamente con MeOH/NH<sub>3</sub>, disolución que es evaporada a sequedad para disolver a continuación con fase móvil. En el caso de Zimmerli y colaboradores (Zimmerli *et al.*, 2001), la homogeneización de la muestra también tiene lugar en medio ácido, pero se lava con diclorometano antes de proceder al cambio de pH. Tras eluir directamente el cartucho PRS con MeOH/NH<sub>3</sub>, se realiza un fraccionamiento utilizando cromatografía de líquidos.

En la tercera parte de la tabla se incluyen los trabajos que describen tratamientos de muestra basados en el inicialmente propuesto por Gross y Grüter en 1992 (Gross *et al.*, 1992). Éste método es muy similar al comentado anteriormente, que proporcionaba únicamente un extracto. La diferencia esencial radica en la recolección de los disolventes de lavado del cartucho de intercambio catiónico, los cuales contienen los analitos apolares. Tras una neutralización con amoniaco y una dilución con agua, la disolución obtenida se hace pasar por un cartucho SPE de C18, del cual se eluyen las HAs con una mezcla MeOH/NH<sub>3</sub>. Finalmente, se evapora el eluido a sequedad y se redisuelve en el disolvente adecuado para originar el extracto final. Todos los tratamientos de muestra incluidos en esta sección siguen fielmente el original, a excepción de pequeñas modificaciones



principalmente en las disoluciones de lavado del cartucho PRS o del disolvente utilizado para redissolver el extracto final (Richling *et al.*, 1999; Balogh *et al.*, 2000; Guy *et al.*, 2000; Olsson *et al.*, 2002). Un grupo asiático propone mezclar los extractos que contienen las HAs polares y apolares antes de su evaporación (Chen *et al.*, 1999; Tai *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2002), para originar así una única disolución que permite determinar conjuntamente todos los analitos.

Para concluir esta sección relacionada con el análisis de HAs en alimentos, en la Tabla 1.7 se incluyen varias publicaciones que utilizan y comparan diversos métodos de tratamiento de muestra. Los tres primeros trabajos reseñados, realizados por nuestro grupo de trabajo, pretenden la evaluación de diversos procedimientos, algunos de los cuales se encontraron en la bibliografía. Al formar parte del trabajo experimental de la memoria, estos dos trabajos se discutirán con mayor detalle en los Capítulos 2 y 3.

En el siguiente trabajo incluido en la Tabla 1.7 (Janoszka *et al.*, 2001) se comparan siete procedimientos destinados a la extracción de los compuestos aminoimidazólicos de muestras de cerdo asado. Los métodos B, C y D son variaciones del de Gross (Gross, 1990), mientras que los otros cuatro (A, E, F y G) incluyen varias etapas sucesivas de LLE seguidos de otra etapa en la que se utiliza algodón azul como adsorbente. Con el fin de realizar la homogeneización y extracción iniciales, en este trabajo se proponen, entre otros, procesos de extracción mediante Soxhlet (métodos C y G) o por microondas (métodos B y F). Los resultados obtenidos mostraron que el método más rápido y eficaz para la extracción de aminoimidazoazarenos de muestras de carne frita era el Método D, basado en el acoplamiento de un cartucho de tierra de diatomeas, uno de intercambio catiónico (PRS) y uno de octadecilsilano.

También se ha incluido en la tabla el trabajo de Bang y colaboradores (Bang *et al.*, 2002), en el que se estudian varias alternativas de homogeneización y extracción iniciales. El tratamiento de limpieza es común en todos los casos, y se basa en el uso de chitin azul, un adsorbente muy similar al algodón azul pero que emplea poli-N-acetilglucosamina como soporte polimérico del pigmento. El método más conveniente para el análisis de las HAs resultó ser el que incluía una etapa inicial con tierra de diatomeas y acetato de etilo como eluyente, el cual era cambiado por hidróxido de sodio previamente al paso por chitin azul (Método D2).

Finalmente, otro grupo de investigadores (Martin *et al.*, 2002) compara diversos métodos de tratamiento de muestra y pone de manifiesto un incremento de la mutagenicidad de una ternera frita después de ser incubada con proteinasa K. Este resultado sugiere la presencia en las muestras de alimentos cocinados de mutágenos no determinables por los métodos tradicionales de extracción.

Tabla 1.7.- Métodos de tratamiento de muestra para el análisis de HAs en alimentos.

Muestra	Analitos*	Extracción inicial	Determ.	Ref.
<b>Tratamientos con etapas aisladas de extracción líquido-sólido</b>				
Ternera a la parrilla	1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16, 17	1. HCl 0,1 M 2. Centrifugar, ajustar a pH 7 con NaOH 2 M, diluir con H <sub>2</sub> O 3. LC: rayón azul, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 4. Evaporar, disolver en MeOH, diluir con Tris-HCl 0,5 M a pH 8,5 y H <sub>2</sub> O 5. SPME: Omegawax 250, eluir con MeOH	LC-MS	(Kataoka <i>et al.</i> , 1999)
Varios alimentos	12, 13	1. HCl 0,1 M 2. TCA, neutralizar, centrifugar 3. LC: algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 4. Evaporar, disolver en MeOH 5. HPLC: TSKgel ODS 120 <sup>®</sup> , eluir con ACN/TF	LC-FD	(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
Extracto de carne	1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13	1. NaOH 1 M + MeOH, centrifugar 2. SPE: EN, lavar con MeOH/NaOH 0,1 M (55:45), hexano, EtOH/hexano (2:8), MeOH/NaOH (55:45) y hexano, eluir con EtOH/DCM (1:9) 3. Evaporar con N <sub>2</sub> , disolver con fase móvil	LC-UV(DAD)	(Vollenbroker <i>et al.</i> , 2000)
Sistema modelo	9	1. HCl 0,1 M 2. SPE: Oasis MCX, lavar con HCl 0,1 M, MeOH y MeOH/NH <sub>3</sub> (40:60), eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (95:5) 3. Evaporar, disolver con MeOH	LC-FD	(Zochling <i>et al.</i> , 2002)
Caballa frita	4, 5, 9, 10	1. HCl 2. MeOH y H <sub>2</sub> O, neutralizar 3. Rayón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> 4. HPLC: TSKgel ODS-120 <sup>®</sup> , eluir con TF pH 2/ACN 5. HPLC: TSKgel SP-2SW, eluir con TF pH 3/ACN 6. HPLC: YMC A303 ODS, eluir con TF pH 2/ACN	LC-UV(DAD) LC-FD	(Gu <i>et al.</i> , 2002)
<b>Tratamientos basados en el método tándem de Gross (1 extracto)</b>				
Concentrado de carne	1, 4, 5, 6	1. HCl 1 M, centrifugar, filtrar 2. Basificar a pH 10,5 con NaOH 6 M 3. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM/tolueno (10:1) 4. SPE: PRS, lavar con HCl 0,1 M y H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar y redissolver en fase móvil	LC-ED	(Krach <i>et al.</i> , 2000)
Sistema modelo	4, 5, 8, TMIP, 9, IFP	1. NaOH 1 M 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con acetato de etilo 3. SPE: PRS, lavar con HCl 0,01 M, MeOH/HCl 0,1 M (4:6) y H <sub>2</sub> O, eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar, disolver con fase móvil	LC-UV(DAD) LC-FD	(Pais <i>et al.</i> , 2000b)
Sistema modelo	3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	1. NaOH 1 M 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM/Tolueno (95:5) 3. SPE: PRS, lavar con HCl 0,01 M, MeOH/HCl 0,1 M (4:6) y H <sub>2</sub> O, eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M a pH 8 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar y disolver en MeOH 6. <i>Muestras más complejas</i> - SPE: CBA, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> - Evaporar y disolver con MeOH	LC-UV(DAD) LC-FD	(Skog <i>et al.</i> , 2000)
Sistema modelo	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, TMIP, IFP	Como referencia (Skog <i>et al.</i> , 2000), eluyendo tierra de diatomeas con acetato de etilo	LC-UV(DAD) LC-FD	(Borgen <i>et al.</i> , 2001)
Sistema modelo	3, 4, 6	1-5. Como referencia (Skog <i>et al.</i> , 2000)	LC-UV(DAD)	(Monti <i>et al.</i> , 2001)

Pollo cocinado y aromas de pollo	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15	Como referencia (Skog <i>et al.</i> , 2000), eluyendo tierra de diatomeas con acetato de etilo	LC-UV(DAD) LC-FD LC-MS	(Solyakov <i>et al.</i> , 2002) (Toribio <i>et al.</i> , 2000b)
Extracto de carne liofilizado	1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 14, 15	1. NaOH 1 M 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 3. SPE: PRS en forma ácida, lavar con MeOH/H <sub>2</sub> O (4:6) y H <sub>2</sub> O, eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M a pH 8 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar y disolver con MeOH		
Varios alimentos	1, 2, 4, 5, 6, 9	1. HCl 0,5 M 2. LLE: lavar con DCM 3. Basificar con NaOH 30 % 4. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 5. SPE: PRS, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (98:20) 6. Añadir EtOH, reducir volumen 7. HPLC: Nucleosil 5 SA, eluir con AcONH <sub>4</sub> /ACN 8. Evaporar, disolver con MeOH	LC-UV	(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)

#### Tratamientos basados en el método *tándem* de Gross y Grüter (2 extractos)

Temera frita	1, 2, 4, 5, 9	1. 1 M NaOH 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 3. SPE: PRS <i>Aminas apolares:</i> - eluir con HCl 0,1 M, MeOH/HCl 0,1 M (60:40) y H <sub>2</sub> O - Neutralizar con NH <sub>3</sub> - Diluir con H <sub>2</sub> O hasta <20% MeOH <i>Aminas polares:</i> - Eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M pH 8 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar, disolver con MeOH	LC-UV LC-FD	(Balogh <i>et al.</i> , 2000)
Varios alimentos	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 16, 17	1-4. Como (Balogh <i>et al.</i> , 2000), lavando cartucho PRS con HCl 0,01 M, MeOH/HCl 0,1 M (60:40) y H <sub>2</sub> O 5. Evaporar con N <sub>2</sub> , derivatizar	GC-MS	(Richling <i>et al.</i> , 1999)
Extracto de carne y bacon a la plancha	1, 3, 4, 5, 6, 9, 7,9-DiMeIglQx	1-4. Como referencia (Balogh <i>et al.</i> , 2000) 5. Evaporar, disolver con MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1)	LC-MS/MS	(Guy <i>et al.</i> , 2000)
Cerdo frito	4, 5, 9, 12, 13	Como referencia (Balogh <i>et al.</i> , 2000), pero lavando PRS con HCl 0,01 M, MeOH/HCl 0,1 M (40:60) y H <sub>2</sub> O	LC-UV(DAD)	(Olsson <i>et al.</i> , 2002)
Pescado	1, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	1. 1 M NaOH 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 3. SPE: PRS <i>Aminas apolares:</i> - eluir con HCl 0,01 M, MeOH/ HCl 0,1 M (40:60) y H <sub>2</sub> O - Neutralizar con NH <sub>3</sub> - Diluir con H <sub>2</sub> O hasta <20% MeOH <i>Aminas polares:</i> - Eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M pH 8 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Combinar fracciones polar y apolar, evaporar y disolver con MeOH	LC-UV(DAD) LC-FD	(Tai <i>et al.</i> , 2001)
Sistema modelo	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	Como 3-5 de referencia (Tai <i>et al.</i> , 2001)	LC-UV	(Chen <i>et al.</i> , 1999)
Alimentos marinados	1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	Como referencia (Tai <i>et al.</i> , 2001)	LC-UV(DAD)	(Lan <i>et al.</i> , 2002)

#### Referencias que aplican varios tratamientos

Extracto de carne liofilizado	1, 2, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	<i>Método A</i> 1. NaOH 1 M 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 3. SPE: PRS, lavar con HCl 0,01 M, MeOH/HCl 0,1 M (4:6) y H <sub>2</sub> O, eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar, disolver con MeOH <i>Método B</i> 1. 1 M NaOH 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 3. SPE: PRS <i>Aminas apolares:</i> - eluir con HCl 0,01 M, MeOH/ HCl 0,1 M (60:40) y H <sub>2</sub> O - Neutralizar con NH <sub>3</sub> - Diluir con H <sub>2</sub> O hasta <20% MeOH <i>Aminas polares:</i> - Eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M pH 8	LC-UV(DAD)	(Toribio <i>et al.</i> , 1999)
-------------------------------	---	--	------------	--------------------------------

		4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar, disolver con MeOH <i>Método C:</i> 1-5 Como método A 6. SPE: SCX, lavar con MeOH/K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,05 M pH 7 (2:3) y H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/AcONH <sub>4</sub> 1 M pH 8 (95:5) 7. Evaporar, disolver con MeOH <i>Método D:</i> 1. NaOH 1 M 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM 3. SPE: PRS en forma ácida, lavar con MeOH/H <sub>2</sub> O (4:6) y H <sub>2</sub> O, eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M a pH 8 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar y disolver con MeOH		
Extracto de carne liofilizado	1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 14, 15	Como método D de referencia (Toribio <i>et al.</i> , 1999), pero utilizando cartuchos PRS y C18 de varios tipos	LC-MS	(Toribio <i>et al.</i> , 2000b)
Extracto de ternera liofilizado	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	<i>Método A:</i> como método D de referencia (Toribio <i>et al.</i> , 1999) <i>Método B:</i> como método B de referencia (Toribio <i>et al.</i> , 1999)	LC-MS/MS	(Toribio <i>et al.</i> , 2002)
Cerdo asado	1, 2, 4, 5, 9	<i>Método A:</i> 1. H <sub>2</sub> O/MeOH, centrifugar, pH 8,5 con NaOH 1 M 2. LC: Amberlita XAD-2, lavar con H <sub>2</sub> O y eluir con acetona y MeOH 3. Evaporar, disolver con H <sub>2</sub> O 4. LLE: acidificar con HCl 1 M, lavar con acetato de etilo 5. LLE: basificar con NaOH, extraer con acetato de etilo 6. Evaporar, disolver con H <sub>2</sub> O 7. LC: algodón azul, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 8. Evaporar, disolver con ACN <i>Método B:</i> 1. Acetona, sonicar 1 h 2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM/tolueno (95:5) 3. SPE: PRS, lavar con HCl 1 M y H <sub>2</sub> O, eluir con AcONH <sub>4</sub> 0,5 M pH 8 4. SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporar y disolver con ACN <i>Método C:</i> 1. Soxhlet con acetona 6 h 2-5. Como método B <i>Método D:</i> 1. NaOH 1 M 2-5. Como método B <i>Método E:</i> 1. Acetona, filtrar 2. -15°C, 18 h, filtrar 3. Evaporar 4. LLE: disolver con HCl 0,1 M, lavar con DCM 5. LLE: basificar con NaOH 6 M, extraer con DCM 6. Como 6-8 método A <i>Método F:</i> 1. Acetona, sonicar 1 h 2. -15°C, 18 h 3-6. Como método E <i>Método G:</i> 1. Soxhlet con acetona 2-6. Como método F	GC-MS	(Janoszka <i>et al.</i> , 2001)
Pollo frito	1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, IFP	1. <i>Método C1:</i> - HCl, centrifugar y filtrar - Ajustar pH a 9 con NaOH, centrifugar <i>Método C2:</i> - NaOH 1 M, centrifugar <i>Método D1:</i> - NaOH 1 M - LLE: tierra de diatomeas, eluir con acetato de etilo <i>Método D2:</i> - NaOH 1 M - LLE: tierra de diatomeas, eluir con acetato de etilo - Evaporar, disolver en NaOH 1 M 2. LC: chitin azul, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 3. Evaporar, disolver con MeOH	LC-MS	(Bang <i>et al.</i> , 2002)

Tenera frita	<p><i>SPTE-1:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. H<sub>2</sub>O, homogeneizar, basificar con NaOH 1M</li> <li>2. LLE: tierra de diatomeas, eluir con DCM</li> <li>3. SPE: PRS, eluir con MeOH/NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>5. Evaporar, disolver en DMSO</li> </ol> <p><i>SPTE-2:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. H<sub>2</sub>O, homogeneizar</li> <li>2. LLE: lavar con DCM</li> <li>3. Basificar con NaOH 1M</li> <li>4. Como 2-5 de SPTE-1</li> </ol> <p><i>PK:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. H<sub>2</sub>O, homogeneizar, incubar con proteinasa K en EDTA 10 mM/Tris 50 mM pH 8, SDS 1 %</li> <li>2. LLE: Extraer con DCM</li> <li>3. Evaporar, disolver con DMSO</li> </ol> <p><i>PK+SPTE:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1-2. Como PK</li> <li>3. Evaporar, disolver con NaOH 1M</li> <li>4. Como 2-5 de SPTE-1</li> </ol>	Mutag.	(Martin <i>et al.</i> , 2002)
--------------	---	--------	-------------------------------

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhIP, 10: AαC, 11: MeAαC, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

### 1.2.1.2. Muestras medioambientales

Las muestras medioambientales que constituyen una fuente de exposición humana de HAs son muy diversas, abarcando desde partículas atmosféricas provenientes de la combustión de materiales hasta el agua de lluvia. Como se puede observar en la Tabla 1.8, donde se recogen los trabajos que analizan HAs en muestras medioambientales, la metodología de extracción y purificación en este tipo de matrices es considerablemente diferente a la del campo alimentario.

Para las muestras líquidas, como agua de lluvia o de río, el tratamiento de muestra comienza directamente con un proceso de extracción utilizando rayón azul (Wu *et al.*, 1995; Kataoka *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2000). Seguidamente, se llevan a cabo varias extracciones líquido-líquido (Kataoka *et al.*, 2000), se realiza un proceso de fraccionamiento con columnas cromatográficas (Ono *et al.*, 2000) o bien se continúa como en el método propuesto por Gross y Grüter comentado en el apartado anterior (Wu *et al.*, 1995).

Las otras muestras, en su mayoría partículas en suspensión en aire, se pasan por trampas líquidas o bien por filtros. En el caso de las trampas, el líquido contenido en las mismas se extrae a continuación con DCM (Felton *et al.*, 1981) o DCM/MeOH (Totsuka *et al.*, 1999), o bien se pone en contacto con rayón azul (Kataoka *et al.*, 1998). En cambio, las HAs retenidas en los filtros se disuelven con HCl (Sasaki *et al.*, 2001) o MeOH (Kanai *et al.*, 1990; Manabe *et al.*, 1993a; Bross *et al.*, 1997), para realizar seguidamente varias extracciones líquido-líquido (Kanai *et al.*, 1990; Manabe *et al.*, 1993a; Sasaki *et al.*, 2001) o una extracción en fase sólida con sílice como adsorbente (Bross *et al.*, 1997). La mayoría

de estos trabajos finalizan la purificación de los analitos con un fraccionamiento mediante cromatografía de líquidos (Kanai *et al.*, 1990; Manabe *et al.*, 1993a; Bross *et al.*, 1997; Totsuka *et al.*, 1999).

Tabla 1.8.- Métodos de tratamiento de muestra para el análisis de HAs en muestras ambientales.

Muestra	Analitos*	Extracción inicial	Determ.	Ref.
Humo de cocinado		1. Trampa fría con H <sub>2</sub> O/iPrOH	Mutag.	(Felton <i>et al.</i> , 1981)
Humo de tabaco	16, 17	2. LLE: ajustar a pH 2,0 con HCl, extraer con DCM 1. Filtro de fibra de vidrio, extraer con MeOH/NH <sub>3</sub> 2. Evaporar 3. LLE: disolver en DCM, extraer con HCl 0,1 M 4. LLE: basificar a pH 10 con NH <sub>3</sub> , extraer con DCM 5. SPE: SI, eluir con MeOH 6. HPLC: Ashahipack ES-502C, eluir con ACN/TF 7. HPLC: Nucleosil C8, eluir con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /ACN	LC-FD	(Kanai <i>et al.</i> , 1990)
Partículas de combustión y cenizas de incineración	9	1. <i>Partículas de combustión:</i> - Como (Kanai <i>et al.</i> , 1990) <i>Cenizas de incineración:</i> - HCl 0,5 M, extraer con DCM 2. SPE: SI, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> 3. HPLC: Asahipack ES-502C, eluir con ACN/TF	LC-FD MS	(Manabe <i>et al.</i> , 1993a)
Lluvia	1, iso-1, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	1. LC: rayón azul, eluir con NH <sub>3</sub> /MeOH (1:50) 2. Evaporar, disolver en DCM 3. SPE: PRS: <i>Aminas apolares:</i> - eluir con HCl 0.1 M, MeOH/HCl 0.1 M (45:55) - neutralizar con NH <sub>3</sub> . - Diluir con H <sub>2</sub> O hasta <20% MeOH <i>Aminas polares:</i> - eluir con NH <sub>4</sub> AcO 0,5 M pH 8 4. SPE: C18, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Recombinar extractos polar y apolar, evaporar y disolver con MeOH	CE-UV(DAD)	(Wu <i>et al.</i> , 1995)
Humo de tabaco	9	1. Filtro Cambridge, extraer con MeOH y filtrar 2. Evaporar, disolver en DCM 3. SPE: Isolute SI, eluir con MeOH 4. HPLC: LiChrospher 100, eluir con ACN/MeOH/H <sub>2</sub> O 5. Evaporar, disolver en fase móvil	LC-ED (electrodos en array)	(Bross <i>et al.</i> , 1997)
Humo de combustión	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 14, 15, 16	1. Solución de la trampa: HCl 0,1 M, ácido ascórbico 20 mM 2. LC: neutralizar, rayón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 3. Evaporar 4. LLE: redisolver en HCl 0,1 M, lavar con hexano 4. LLE: basificar con NH <sub>3</sub> , extraer con DCM 5. Evaporar, disolver en MeOH y derivatizar	GC-NPD	(Kataoka <i>et al.</i> , 1998)
Agua de río	1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16	Como 2-5 de referencia (Kataoka <i>et al.</i> , 1998)	GC-NPD GC-MS	(Kataoka <i>et al.</i> , 2000)
Humo de tabaco	12, 13	1. H <sub>2</sub> O 2. LLE: Extraer con MeOH/CHCl <sub>3</sub> (1:1) 3. Evaporar, disolver en MeOH y diluir con H <sub>2</sub> O 4. LC: algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> 5. Evaporar, disolver en MeOH 6. LC: TIN-100 H05E, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (10:1) 7. HPLC: TSKgel ODS 120A, eluir con ACN/TF	LC-FD	(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
Agua de río	14, 15	1. LC: rayón azul, lavar con H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 2. Evaporar, redisolver en MeOH 3. HPLC: Prep-ODS, eluir con MeOH/TF 4. HPLC: Ashahipack ES-502C, eluir con TF/ACN 5. HPLC: TSKgel ODS 120A, eluir con ACN/TF	Mutag. LC-UV MS	(Ono <i>et al.</i> , 2000)
Humo de tabaco	1, 9, 15, 16, 17	1. Retener en filtros, extraer con HCl 0.1 M 2. LLE: lavar con DCM 3. LLE: basificar con NaOH 1 M, extraer con DCM 4. Derivatizar	GC-MS	(Sasaki <i>et al.</i> , 2001)

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhIP, 10: AαC, 11: MeAαC, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

### 1.2.1.3. Muestras biológicas

Las muestras biológicas analizadas en los diferentes trabajos publicados incluyen orina, heces y sangre, aunque en algunos casos se han analizado cultivos microsómicos e incluso leche materna y pelo (Tabla 1.9). En algunos casos, el objetivo principal es aislar las HAs o sus metabolitos para realizar estudios metabólicos, mientras que en otros se proponen métodos para cuantificar HAs o metabolitos como biomarcadores de exposición. Dado que la mayoría de muestras son líquidas, la etapa inicial consiste en un ajuste de pH para adecuarlo al proceso posterior (Kanai *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1989; Breyer-Pfaff *et al.*, 1996; Friesen *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2001), en una centrifugación para eliminar partículas en suspensión (Vavrek *et al.*, 1990; Malfatti *et al.*, 1999; Prabhu *et al.*, 2001) o en una sonicación para dispersar las macromoléculas (De Bruin *et al.*, 2001). En el caso de muestras sólidas, si éstas son heces se homogeneizan con tampón fosfato/MeOH (Vavrek *et al.*, 1990), con agua (Frandsen *et al.*, 2002) o con EtOH/HCOONH<sub>4</sub> (Dragsted *et al.*, 1995), mientras que el pelo se lava primero y se ataca después con hidróxido sódico a 100°C (Hegstad *et al.*, 2002).

En algunos casos, antes de proceder a la purificación de la muestra se realiza una hidrólisis a temperaturas entre 70-100°C, bien en medio ácido (Dragsted *et al.*, 1995; Reistad *et al.*, 1997; Stillwell *et al.*, 1997; De Bruin *et al.*, 2001) o alcalino (Friesen *et al.*, 2001). En cuanto a las operaciones realizadas tras las etapas iniciales, éstas siempre consisten en extracciones con diferentes disolventes, en fraccionamientos con columnas analíticas o en procesos de purificación con adsorbentes.

Los autores que incluyen la LLE en el tratamiento de la muestra suelen hacerlo basificando la disolución obtenida y extrayendo los analitos con un disolvente orgánico, como acetato de etilo (Murray *et al.*, 1989; Reistad *et al.*, 1997; Stillwell *et al.*, 1997; Stillwell *et al.*, 1999a; Friesen *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2001), TBME (Breyer-Pfaff *et al.*, 1996) o DCM (Stormer *et al.*, 1987). En muchos casos, se realiza una purificación adicional mediante sucesivos procesos de partición entre disolventes (Murray *et al.*, 1989; Breyer-Pfaff *et al.*, 1996; Stillwell *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 2001).

La mayoría de trabajos centra la purificación de la muestra en el uso de adsorbentes. Entre los materiales de origen comercial más comúnmente utilizados en extracción en fase sólida (SPE) se encuentran los consistentes en rellenos de base sílice de C18 (Frandsen *et al.*, 2000; Friesen *et al.*, 2001; Knize *et al.*, 2001; Prabhu *et al.*, 2001; Frandsen *et al.*,

2002) o con grupos funcionales carboxilo (Knize *et al.*, 2001) o hidroxilo (Frandsen *et al.*, 2000). Otros adsorbentes utilizados para la SPE han sido polímeros PS-DVB (Knize *et al.*, 2001; Hegstad *et al.*, 2002) y los llamados adsorbentes mixtos, consistentes en mezclas de materiales apolares y de intercambio iónico, de base sílice (Hegstad *et al.*, 2002) o polimérica (De Bruin *et al.*, 2001).

Para el proceso de purificación de muestra también se han utilizado las resinas de intercambio iónico Amberlita XAD-2 (Peluso *et al.*, 1991; Malfatti *et al.*, 1999), el gel de sílice (Stormer *et al.*, 1987) o el algodón azul (Manabe *et al.*, 1987; Kanai *et al.*, 1988; Peluso *et al.*, 1991; Ushiyama *et al.*, 1991). También se han desarrollado materiales más específicos como anticuerpos monoclonales (Dragsted *et al.*, 1995; Stillwell *et al.*, 1997; Stillwell *et al.*, 1999a; Stillwell *et al.*, 1999b) o polímeros de huella molecular (Frandsen *et al.*, 2002).

Para concluir, hay que comentar que algunos trabajos aíslan las HAs de interés en fracciones obtenidas utilizando cromatografía de líquidos (Manabe *et al.*, 1987; Kanai *et al.*, 1988; Peluso *et al.*, 1991; Ushiyama *et al.*, 1991).

Tabla 1.9.- Métodos de tratamiento de muestra para el análisis de HAs en muestras biológicas.

Muestra	Analitos*	Tratamiento de muestra	Determ.	Ref.
Plasma	16, 17	1. Digestión con proteinasa K 2. LC: algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> 3. HPLC: PREP-ODS, eluir con MeOH/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4. HPLC: gel polimérico, eluir con K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	LC-UV LC-FD Mutag.	(Manabe <i>et al.</i> , 1987)
Orina, heces y bilis	1, 2 y metab.	1. LLE: basificar con NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M, extraer con DCM 2. LC: gel de sílice, eluir con DCM/MeOH (1:1)	TLC-FD MS NMR	(Stormer <i>et al.</i> , 1987)
Orina, bilis, hígado y pulmón	16, 17 y metab.	1. LC: neutralizar, algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 2. HPLC: PREP-ODS, eluir con MeOH/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 3. HPLC: Asahipack ES-502, eluir con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 4. HPLC: Nucleosil C8, eluir con MeOH/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	MS	(Kanai <i>et al.</i> , 1988)
Orina	4	1. LLE: basificar con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1 M, extraer con acetato de etilo 2. LLE: extraer con HCl 0,1 M 3. LLE: lavar con acetato de etilo 4. Evaporar y derivatizar	GC-MS	(Murray <i>et al.</i> , 1989)
Orina	4, 9	Como referencia (Murray <i>et al.</i> , 1989)	GC-MS	(Murray <i>et al.</i> , 2001)
Orina y heces	5-OH-1	<i>Orina:</i> 1. Centrifugación <i>Heces:</i> 1. TF/MeOH 2. Filtrar	LC-UV	(Vavrek <i>et al.</i> , 1990)
Orina	9	1. LC: Amberlita XAD-2, eluir con DCM y acetona 2. LC: algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> 3. HPLC: ODS, eluir con H <sub>2</sub> O/ACN	Mutag.	(Peluso <i>et al.</i> , 1991)
Orina	4, 9, 14, 15	1. LC: agua, algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (50:1) 2. LC: TIN-100 H05E, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (10:1) 3. HPLC: TSKgel ODS 120A, eluir con ACN/TF	LC-UV(DAD) LC-FD	(Ushiyama <i>et al.</i> , 1991)
Orina y heces	5, 9 y metab.	1. <i>Orina:</i> - Hidrólisis: HCl, 95 °C - Neutralizar - SPE: C18, eluir con EtOH/HCOONH <sub>4</sub> (1:1)	LC-UV(DAD) LC-RD	(Dragsted <i>et al.</i> , 1995)



		<i>Heces:</i>		
		- EtOH/HCOONH <sub>4</sub> (1:4), centrifugar		
		2. LC: anticuerpo ProSep A, eluir con ACN/ HCOONH <sub>4</sub> (1:1)		
Plasma	12, 13	1. LLE: basificar con NaOH 0,2 M, añadir Triton X 100, extraer con TBME	LC-FD	(Breyer-Pfaff <i>et al.</i> , 1996)
		2. LLE: extraer con 25 mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
		3. LLE: lavar con TBME		
		4. LLE: basificar con NaOH, extraer con TBME		
		5. Evaporar, disolver en fase móvil		
Orina	4, 5, 4-OH-9	1. Hidrólisis: HCl 1 M, 100°C	GC-MS	(Reistad <i>et al.</i> , 1997)
		2. LLE: basificar con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1 M, extraer con acetato de etilo		
		3. LLE: extraer con 0,1 M HCl		
		4. LC: neutralizar, algodón azul, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (99:1)		
Orina	4, 9 y metab.	1. Hidrólisis: HCl 1M, 70°C, 4 h	LC-ESI-MS/MS	(Stillwell <i>et al.</i> , 1997)
		2. LLE: basificar, extraer con acetato de etilo		
		3. -16°C, decantar		
		4. LLE: extraer con 0,1 M HCl		
		5. Evaporar y disolver con TF, ajustar a pH 8 con NaOH 0,1 M		
		6. LC: anticuerpos, eluir con AcOH 1 M		
		7. Evaporar		
		8. LLE: redisolver en Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5 M, extraer con acetato de etilo		
		9. Evaporar, disolver en fase móvil		
Orina	9	Como referencia (Stillwell <i>et al.</i> , 1997)	LC-MS	(Kidd <i>et al.</i> , 1999)
Orina y sangre	9 y metab.	<i>Orina:</i>	LC-UV(DAD)	(Malfatti <i>et al.</i> , 1999)
		1. LC: Amberlita XAD-2, eluir con MeOH/NH <sub>3</sub> (9:1)	LC-FD	
		<i>Sangre:</i>	LC-RD	
		1. Centrifugar, decantar		
		2. Añadir MeOH, centrifugar		
Orina	N-OH-4 y metab.	1. Diluir con AcONH <sub>4</sub> 0,1 M a pH 7,1	GC-MS	(Stillwell <i>et al.</i> , 1999a; Stillwell <i>et al.</i> , 1999b)
		2. SPE: Bond Elut Certify II, lavar con MeOH, eluir con MeOH/AcOH 1 M (80:20)		
		3. Neutralizar con NH <sub>3</sub> , evaporar y disolver en AcONH <sub>4</sub> 50 mM a pH 5,5		
		4. LC: anticuerpos, lavar con AcONH <sub>4</sub> 50 mM y H <sub>2</sub> O, eluir con MeOH/H <sub>2</sub> O		
		5. Evaporar e hidrolizar con AcOH/ACN/H <sub>2</sub> O (50:45:5) a 75°C, 2 h		
		6. Evaporar		
		7. LLE: disolver con Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , extraer con acetato de etilo		
		8. Evaporar y derivatizar		
Orina	5-OH-9	1. AcONa 50 mM a pH 5,5 + β-glucuronidasa/arilsulfatasa	LC-UV(DAD)	(Frandsen <i>et al.</i> , 2000)
		2. SPE: C18, lavar con Tris 0,1 M/ACN (15:85) y H <sub>2</sub> O, eluir con HCOONH <sub>4</sub> 50 mM pH 3,5/ACN (2:8)		
		3. Evaporar con N <sub>2</sub> y disolver con DMF/acetato de etilo (1:4)		
		4. SPE: Bond Elut 2OH, lavar con HCOOH/MeOH/acetato de etilo (1:100:900), eluir con HCOOH/MeOH (1:100)		
		5. Evaporar, disolver con HCOOH 0,1 %/DMF (1:1)		
Orina y heces	9 y metabolitos	<i>Orina de rata:</i> como referencia (Frandsen <i>et al.</i> , 2000)	LC-MS/MS	(Frandsen <i>et al.</i> , 2002)
		<i>Heces de rata:</i>		
		- H <sub>2</sub> O, homogeneizar		
		- DMF/HCOONH <sub>4</sub> 50 mM pH 3,5 (75:25), centrifugar		
		- Tris 0,1 M pH 10		
		- SPE: C18, lavar con H <sub>2</sub> O y eluir con MeOH		
		- Evaporar, seguir como referencia (Frandsen <i>et al.</i> , 2000)		
		<i>Orina humana:</i>		
		1. Incubar en AcONa 50 mM pH 5,5 y β-glucuronidasa/arilsulfatasa		
		2. SPE: C18, lavar con MeOH/H <sub>2</sub> O (10:90), eluir con MeOH		
		3. Evaporar, disolver en MeOH/H <sub>2</sub> O (80:20) con HCOOH 0,1 %		
		4. LC: MIP, eluir con MeOH/H <sub>2</sub> O (80:20), MeOH, H <sub>2</sub> O, TEA 0,1 % en H <sub>2</sub> O y TEA 0,1 % en MeOH/H <sub>2</sub> O (10:90)		
		5. Evaporar, disolver en ACN/H <sub>2</sub> O (25:75) con HCOOH 0,1 %		
Leche	4, 9, 10, 17	1. Sonicar, 50°C, 5 min	LC-MS	(De Bruin <i>et al.</i> , 2001)
		2. hidrólisis: HCl 0,1 M, 50°C, 5 min		
		3. SPE: Oasis MCX, lavar con HCl 0,1 M, DCM/MeOH (2:1), MeOH y MeOH/NH <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O (20:5:75), eluir con ACN/NH <sub>3</sub> (95:5)		
		4. Evaporar, disolver en fase móvil		

Orina	9	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M pH 8</li> <li>2. Hidrólisis: NaOH 1M, 100°C</li> <li>3. LLE: extraer con acetato de etilo</li> <li>4. Evaporar, disolver con MeOH/Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M pH 7 (2:500)</li> <li>5. SPE: C18, lavar con MeOH/H<sub>2</sub>O (45:55), eluir con MeOH/H<sub>2</sub>O (60:40)</li> <li>6. Evaporar, disolver con MeOH y derivatizar</li> </ol>	GC-MS	(Friesen <i>et al.</i> , 2001)
Orina	9	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. SPE: Oasis HLB, eluir con MeOH</li> <li>2. Evaporar, disolver con HCl 0,01 M, centrifugar y filtrar</li> <li>3. SPE: SCX, lavar con MeOH/HCl 0,01 M (10:90), eluir con AcONH<sub>4</sub> 0,5 M pH 8</li> <li>4. SPE: C18, lavar con MeOH/H<sub>2</sub>O (5:95), eluir con MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50)</li> </ol>	LC-MS/MS	(Knize <i>et al.</i> , 2001)
Cultivo de microsomas	9 y metabolitos	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Centrifugar</li> <li>2. SPE: C18, lavar con H<sub>2</sub>O, eluir con AcONH<sub>4</sub> 0,1 M pH 3,5/MeOH (2:8)</li> <li>3. Evaporar, disolver con H<sub>2</sub>O/MeOH (9:1)</li> </ol>	LC-MS	(Prabhu <i>et al.</i> , 2001)
Pelo	9	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavar con SDS 0,1 %, centrifugar</li> <li>2. Hidrólisis: NaOH 1 M, 100°C, 1 h</li> <li>3. SPE: Bond Elut ENV, lavar con H<sub>2</sub>O, MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) y MeOH, eluir con acetato de etilo/NH<sub>3</sub> en MeOH (1:1)</li> <li>4. Evaporar, disolver en MeOH/HCOOH 10 mM (1:9)</li> <li>5. SPE: Isolute HXC, eluir con MeOH y acetato de etilo/NH<sub>3</sub> en MeOH (7:3)</li> <li>6. Evaporar y derivatizar</li> </ol>	GC-MS	(Hegstad <i>et al.</i> , 2002)

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhIP, 10: AαC, 11: MeAαC, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

### 1.2.2. Métodos de determinación

La estructura de las HAs consta de varios anillos aromáticos conjugados, algunos de los cuales tienen uno o más nitrógenos. Además, todos los analitos, excepto los comutágenos harman y norharman, tienen un grupo amino primario unido a uno de los anillos (Figuras 1.2 y 1.4). Es por ello que el análisis de estas sustancias puede ser realizado utilizando la cromatografía de líquidos (LC) como técnica de separación. Por otro lado, todas las HAs tienen un espectro UV característico con elevados coeficientes de extinción molar, pueden ser oxidadas electroquímicamente y algunas son fluorescentes, lo que hace posible la detección UV, ED o FD. Otra alternativa es la espectrometría de masas (MS) con ionización a presión atmosférica, ya que las HAs se protonan con facilidad proporcionando picos intensos adecuados para la cuantificación. Estos mismos sistemas de detección pueden ser utilizados en electroforesis capilar (CE), una técnica de separación de elevada eficacia. También es posible el uso de la cromatografía de gases (GC) con detección de captura de electrones o selectiva de nitrógeno. Por supuesto, la MS también puede ser utilizada en combinación con la GC. Por último, en la bibliografía se pueden encontrar trabajos que determinan HAs mediante técnicas de inmunoensayo (ELISA), muy sensibles pero a la vez complejas y con el peligro de reacciones cruzadas. Las técnicas de determinación de aminas heterocíclicas han sido recopiladas en varios trabajos (Knize *et al.*, 1992; Kataoka, 1997; Knize *et al.*, 1998a; Herraiz, 2000a; Pais *et al.*, 2000a).

Uno de los aspectos más importantes en el análisis de las HAs es la confirmación de la identidad de los picos cromatográficos, ya que puede producirse una coelución con interferencias coextraídas de la muestra de naturaleza química muy parecida a la de los analitos. El instrumento asequible es el detector ultravioleta con series de diodos (UV-DAD), que permite una identificación en línea comparando el espectro ultravioleta del pico cromatográfico con el correspondiente a una disolución patrón aunque su selectividad es poco elevada. La técnica de espectrometría de masas, aunque mucho más cara, permite una detección mucho más selectiva y sensible además de una confirmación de la identidad mediante la obtención del espectro de masas.

### 1.2.2.1. Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos es una de las técnicas analíticas más ampliamente utilizadas para la determinación de las aminas heterocíclicas. Los primeros trabajos que aplicaron la LC lo hicieron con el objetivo de obtener fracciones, en las cuales se medía la mutagenicidad mediante el test de Ames (Kasai *et al.*, 1979; Felton *et al.*, 1981; Herikstad, 1984; Hayatsu *et al.*, 1986; Abu-Shakra *et al.*, 1988) o se realizaba un inmunoensayo ELISA (Vanderlaan *et al.*, 1988; Vanderlaan *et al.*, 1991). Otros autores se ayudaron del registro de la señal UV (Hargraves *et al.*, 1983; Felton *et al.*, 1984; Taylor *et al.*, 1985) o de fluorescencia (Manabe *et al.*, 1993b) para medir únicamente la mutagenicidad de las fracciones de interés. En otros trabajos, la cromatografía de líquidos se utilizó para aislar las HAs presentes en diferentes matrices, por lo que después de varias etapas de purificación y de fraccionamiento los analitos se caracterizaban por su espectro UV (Taylor *et al.*, 1985; Felton *et al.*, 1986a), de fluorescencia (Manabe *et al.*, 1993b), MS (Taylor *et al.*, 1985; Grose *et al.*, 1986; Felton *et al.*, 1986a) o de resonancia magnética nuclear (NMR) (Skog *et al.*, 1992b). El fraccionamiento por LC fue también utilizado por algunos autores para estudiar la influencia sobre la actividad mutagénica generada que ejercía la adición de diversas sustancias (Skog *et al.*, 1992a; Kato *et al.*, 1998; Yamagishi *et al.*, 2000), la temperatura de cocción (White *et al.*, 2001) o el recipiente utilizado (Gu *et al.*, 2001).

Sin embargo, la cromatografía de líquidos se ha utilizado mayoritariamente para la determinación analítica de las HAs. En la Tabla 1.10 se incluye un resumen de las aplicaciones en las que se ha medido la respuesta del efluente mediante detectores UV, ED o FD. Debido al elevado número de publicaciones y dado que en la bibliografía se puede encontrar una recopilación bastante completa que incluye los trabajos hasta el año 1998 (Pais *et al.*, 2000a), se ha optado por recoger en la Tabla 1.10 los trabajos posteriores al citado año. Como se puede apreciar, la absorción UV es la técnica de detección más popular (Chen *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2000; Zimmerli *et al.*, 2001), ya que permite detectar simultáneamente la mayoría de HAs a longitudes de onda de aproximadamente 260 nm. Además, el uso del detector de diodos en serie (DAD) (Toribio *et al.*, 1999; Vollenbroeker *et al.*, 2000; Janoszka *et al.*, 2001; Malfatti *et al.*, 2001; Monti *et al.*, 2001; Frandsen *et al.*, 2002; Frederiksen *et al.*, 2002; Lan *et al.*, 2002; Olsson *et al.*, 2002) permite una cierta confirmación del pico cromatográfico mediante la comparación del espectro UV con el correspondiente a una disolución patrón. En estos casos, los límites de

detección (LODs) para disoluciones patrón se encuentran generalmente entre 0,05 y 1 ng (Toribio *et al.*, 1999; Tai *et al.*, 2001; Zimmerli *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2002). En el caso de muestras, dependiendo de la complejidad de la matriz y de la eficiencia del método de tratamiento de muestra, los valores oscilan en general entre 0,1 y 1 ng/g para el caso de alimentos cocinados (Zimmerli *et al.*, 2001) y entre 3 y 20 ng/g para aromas y extractos de carne (Toribio *et al.*, 1999; Vollenbroeker *et al.*, 2000).

Debido a los relativamente elevados límites de detección de la combinación LC-UV y a la baja selectividad de este sistema de detección, algunos autores han optado por el uso del detector de fluorescencia, ya que proporciona límites de detección del orden de 0,5-10 pg inyectados para disoluciones estándar (Manabe *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1998). En el caso de muestras, los LODs están alrededor de 0,1-1 ng/g para cualquier tipo de muestra (Schwarzenbach *et al.*, 1992; Knize *et al.*, 1994). Desgraciadamente, con esta técnica se restringe el análisis a la determinación de carbolinas y/o PhIP, que son las únicas HAs fluorescentes. Es por ello que muchos autores utilizan el detector de fluorescencia conjuntamente con otro tipo de detección, como UV, FD o ED (Murkovic *et al.*, 1998; Arvidsson *et al.*, 1999; Pais *et al.*, 1999; Skog *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2001; Solyakov *et al.*, 2002). Incluso en un trabajo se han utilizado tres detectores, UV, fluorescencia y ED, para el análisis de aromas (Schwarzenbach *et al.*, 1992).

Por último, cabe señalar que el detector electroquímico se ha empleado en diversos estudios (Bross *et al.*, 1997; Krach *et al.*, 2000). Este tipo de detección proporciona en general límites de detección entre 0,01 y 1 ng para todos los analitos estudiados en el caso de patrones (Galceran *et al.*, 1996b; Krach *et al.*, 2000). En muestras, el valor es de 0,01-0,05 ng/g para carne y pescado procesados (Wakabayashi *et al.*, 1993), y aumenta hasta 4,2-8,4 ng/g (Rivera *et al.*, 1996) e incluso 50 ng/g (Schwarzenbach *et al.*, 1992) para muestras más complejas como aromas o extractos de carne.

Tabla 1.10.- Métodos de cuantificación de las HAs basados en LC conjuntamente con detectores ultravioleta, electroquímicos o de fluorescencia.

Analitos*	Muestra	Sistema analítico	Columna	Fase móvil	Ref.
A) 1, 2, 3, 4, 5, 6 B) 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	jugo de carne de ternera	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM AcTEA pH 3,2/10 mM AcTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Arvidsson <i>et al.</i> , 1999)
A) 1, 2, 4, 5 B) 9	ternera	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,2/ACN, grad., 1 mL/min	(Balogh <i>et al.</i> , 2000)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	sistema modelo	LC-UV	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	0,05 M AcONH <sub>4</sub> pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Chen <i>et al.</i> , 1999)

9	sistema modelo	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	LiChrospher 60 RP-Select B (5µm, 250x4 mm)	MeOH/ACN/ AcOH/H <sub>2</sub> O (15:25:2:58) pH 5,1, 1 mL/min	(Murkovic <i>et al.</i> , 1999)
4, 5, 9, IFP	varios alimentos	LC-UV(DAD) LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Norrish <i>et al.</i> , 1999)
1, 2, 3, 4, 4-MeIQx, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, TMIP, IFP, 14, 15, 16, 17	varios alimentos	LC-UV(DAD) LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Pais <i>et al.</i> , 1999)
A) 1, 2, 3, 4, 5, 6 B) 9	aromas, concentrados de carne, residuos de sartén	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,2/10mM FTEA pH 3,5/ACN, grad., 1 mL/min	(Solyakov <i>et al.</i> , 1999)
1, 2, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	extracto de carne liofilizado	LC-UV(DAD)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,3/ACN, grad., 1 mL/min	(Toribio <i>et al.</i> , 1999)
12, 13	humo de cigarro y de cocinado	LC-FD	TSKgel SP-2SW (5µm, 4,6x300) + YMC A303 ODS (5µm, 250x4,6)	25 mM TF pH 2/ACN, 0,8 mL/min	(Totsuka <i>et al.</i> , 1999)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17	disolución estándar	LC-UV	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	0,05 M AcONH <sub>4</sub> pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Chiu <i>et al.</i> , 2000)
1, 4, 5, 6	cubitos de caldo	LC-ED (array culombimétrico)	Luna phenyl-hexil (250x2 mm, 2 µm)	30 mM TCA pH 2,5/THF (96:4), 0,23 mL/min	(Krach <i>et al.</i> , 2000)
4, 5, 8, TMIP, 9, IFP	sistema modelo	LC-UV(DAD) LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	0,01 M FTEA pH 3,2/ACN, grad., 1 mL/min	(Pais <i>et al.</i> , 2000b)
A) 3, 4, 5 B) 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	jugo de carne de ternera	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM AcTEA pH 3,2/10 mM AcTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Skog <i>et al.</i> , 2000)
1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13	extracto de ternera	LC-UV(DAD)	A) Zorbax SB-Phenyl (5µm, 250x4,6 mm) B) LiChrospher RP18e (5µm, 125x4 mm)	0,01 M FTEA pH 3/ACN, grad., 1 mL/min	(Vollenbrok <i>et al.</i> , 2000)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, TMIP, IFP	jugo de carne de buey, cerdo y pollo	LC-UV(DAD) LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM AcTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Borgen <i>et al.</i> , 2001)
A) 4 B) 9, 10, 12, 17	leche humana	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	Phenomenex IB-SIL C18-BDS (5µm, 250x4,6)	10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 4/ACN, grad., 1 mL/min	(De Bruin <i>et al.</i> , 2001)
A) 3, 4, 5 B) 9, 10, 14, 15	varios alimentos	A)LC-UV(DAD) B)LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Heddle <i>et al.</i> , 2001)
1, 2, 4, 5, 9	cerdo	LC-UV(DAD)	A) SynChropak RP-8 (5µm, 250x4,6 mm) B) TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	A) FTEA pH 3,2/ACN, grad., 1 mL/min B) FTEA pH 3,3/ACN, grad., 1 mL/min	(Janoszka <i>et al.</i> , 2001)
9 y metabolitos	microsomas	LC-UV(DAD)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	TEA pH 6/MeOH, grad., 1 mL/min	(Malfatti <i>et al.</i> , 2001)
3, 4, 5	sistema modelo	LC-UV(DAD)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM AcTEA pH 3,2/10 mM AcTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Monti <i>et al.</i> , 2001)
10, 11, 12, 13	pescado	LC-UV(DAD) LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	0,05 M AcONH <sub>4</sub> pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Tai <i>et al.</i> , 2001)
1, 2, 4, 5, 6, 9	varios alimentos	LC-UV	LiChrospher 60 rp-select B (5µm, 250x4 mm)	A) 0,01 M FTEA pH 3,3/ACN, grad., 1 mL/min B) 0,05 M AcONH <sub>4</sub> pH 4,7/MeOH, grad., 1 mL/min	(Zimmerli <i>et al.</i> , 2001)
9 y metabolitos	orina y heces	LC-UV(DAD)	Zorbax SB-C3 (5µm, 150x3 mm)	0,01 % HCOOH/ACN, grad., 0,4 mL/min	(Frandsen <i>et al.</i> , 2002)
10, 11 y metabolitos	microsomas	LC-UV(DAD)	Zorbax SB-C3 (5µm, 150x3 mm)	1 % HCOOH/ACN, grad., 0,4 mL/min	(Frederiksen <i>et al.</i> , 2002)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	alimentos marinados	LC-UV(DAD)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	50 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Lan <i>et al.</i> , 2002)
4, 5, 9, 12, 13	cerdo	LC-UV(DAD)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	0,01 M AcTEA pH 3,6/ACN, grad., 1 mL/min	(Olsson <i>et al.</i> , 2002)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15	pollo y aromas de pollo	LC-UV(DAD) LC-FD	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM FTEA pH 3,2/10mM FTEA pH 3,5/ACN, grad., 1 mL/min	(Solyakov <i>et al.</i> , 2002)
9	sistema modelo	LC-FD	LiChroCART Superspher 60RP-select B (5µm, 125x2mm)	MeOH/ACN/ AcONH <sub>4</sub> pH 5/H <sub>2</sub> O, grad., 0,4 mL/min	(Zochling <i>et al.</i> , 2002)

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhIP, 10: AαC, 11: MeAαC, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

En cuanto a la separación cromatográfica, ésta ha sido llevada a cabo en fase invertida, utilizando como fase móvil mezclas hidroorgánicas generalmente a pH ácido y columnas con relleno apolar como fase estacionaria. En el caso de las detecciones UV y FD la columna más ampliamente utilizada ha sido sin duda la TSKgel ODS 80 TM, con partículas de 5  $\mu\text{m}$  de C18 y con unas dimensiones de 4,6 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud. Esta columna ha permitido una eficiente separación de un elevado número de HAs, proporcionando una buena simetría de pico gracias a un tratamiento especial de desactivación de silanoles y al uso de trietilamina en los tampones acuosos. Así, varios autores han elegido el fosfato de trietilamina a pH 3,6 (Norrish *et al.*, 1999; Pais *et al.*, 1999; Heddle *et al.*, 2001) o a pH 3,2 (Balogh *et al.*, 2000; Pais *et al.*, 2000b), y han realizado eluciones en gradiente a 1 mL min<sup>-1</sup> con acetonitrilo como modificador orgánico. En otros casos, el tampón fosfato a pH 3,6 se ha sustituido por acetato al mismo pH (Chen *et al.*, 1999; Chiu *et al.*, 2000; Borgen *et al.*, 2001; Tai *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2002; Olsson *et al.*, 2002). El inconveniente del uso de un único pH es que la determinación conjunta de Glu-P-1, MeIQ, Trp-P-2 y PhIP es muy crítica, por lo que se ha propuesto un gradiente ternario que combina el uso de tampones fosfato o acetato de trietilamina a pH 3,2 y 3,6. Este sistema de elución permite la separación de casi la totalidad de HAs (Gross *et al.*, 1992; Skog *et al.*, 1995).

Dado que en el caso de las determinaciones mediante LC-ED la elución por gradiente distorsiona la línea de base y el uso de trietilamina no es posible, algunos autores han buscado fases móviles isocráticas consistentes en tampón fosfato a pH 2 con un 3 % de acetonitrilo (Yamashita *et al.*, 1986) o acetato de amonio a pH 4 con un 10 % de acetonitrilo (Rivera *et al.*, 1996) para trabajar con la Columna TSKgel ODS 80 TM. En otra referencia (Galceran *et al.*, 1996b), se propone el uso de dos condiciones diferentes para el análisis de los extractos polar y apolar obtenidos tras el tratamiento de muestra, lo que permite la determinación de un mayor número de analitos. En otros trabajos, se ha optimizado la separación con otras columnas, como la LiChrospher 60 RP-Select B (Murkovic *et al.*, 1998) o la Luna phenyl-hexil (Krach *et al.*, 2000). En estos casos, las fases móviles empleadas han sido acetato de amonio a pH 5,1 con un 20 % de acetonitrilo y un 10 % de metanol y ácido tricloroacético a pH 2,5 con un 4 % de tetrahidrofurano, respectivamente.

## 1.2.2.2. Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS)

El acoplamiento LC-MS combina la efectividad en la separación y la versatilidad de la cromatografía de líquidos con la elevada sensibilidad y selectividad de la espectrometría de masas. Dado que el espectrómetro de masas funciona como un detector específico del analito, las posibles interferencias quedan considerablemente reducidas comparado con otras técnicas de detección, con lo cual es posible simplificar los complejos tratamientos de muestra empleados comunmente. Otra ventaja de la combinación LC-MS es la posibilidad de confirmar la identidad del analito mediante el espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico. Además, algunos instrumentos, como el de triple cuadrupolo o el de trampa iónica, permiten la realización de experimentos MS/MS, que posibilitan una detección aún más selectiva que la MS. Todas estas cualidades, junto con las mejoras introducidas en los últimos años en el acoplamiento entre las dos técnicas, han facilitado la aparición de un creciente número de publicaciones que analizan HAS mediante LC-MS (Tabla 1.11).

Tabla 1.11.- Métodos de análisis de HAS basados en LC-MS.

Analitos*	Muestra	Sistema analítico	Columna	Fase móvil	Ref.
1, 2	salmón	LC-MS (Q, termospray, SIM)	µBondapak NH <sub>2</sub> (5µm, 4x300 mm)	Hexano/0,1% AcOH en PrOH (1:3), 1,5 mL/min	(Edmons <i>et al.</i> , 1986)
14, 15	pirolizado Trp	LC-MS (Q, TS, SIM)	Supelcosil LC-18 DB (5µm, 250x4,6 mm)	0,1 M AcONH <sub>4</sub> +TEA 0,01 M pH 7,5/ACN/MeOH (60:32:8), 1,3 mL/min	(Milon <i>et al.</i> , 1987)
1, 4, 5, 6	extracto de ternera, ternera	LC-MS (Q, TS, SIM)	Supelco LC-18-DB (5µm, 250x4,6 mm)	0,1 M AcONH <sub>4</sub> pH 6,8/ACN/MeOH, grad., 1 mL/min	(Turesky <i>et al.</i> , 1988)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	varios alimentos	LC-MS/MS (QqQ, TS)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,2/10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 4,5/ACN, grad., 1 mL/min	(Gross <i>et al.</i> , 1993)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 16, 17, 12, 13, 14, 15	sistema modelo	LC-MS (QqQ, ESI, SIM)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	B) 10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,2/10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 4/ACN, grad., 1 mL/min	(Johansson <i>et al.</i> , 1995a)
1, 9, 10, 12, 13, 14, 15	extracto de ternera	LC-MS (QqQ, ESI, SIM)	Hypersil C18 (5µm, 1x100 mm)	5 mM AcONH <sub>4</sub> pH 6,7/ACN, grad., 50 µL/min	(Galceran <i>et al.</i> , 1996a)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	disolución de patrones	LC-MS/MS (QqQ, ESI, MRM)	LiChrospher 60-RP select B (5µm, 100x2mm)	0,05 % TFA/MeOH/ACN, grad., 200 µL/min	(Richling <i>et al.</i> , 1996)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17	varios alimentos	LC-MS (Q, ESI, SIM)	TSK ODS Super (2µm, 100x4,6 mm)	10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,2/10 mM AcONH <sub>4</sub> pH 4/ACN, grad., 1 mL/min	(Fay <i>et al.</i> , 1997)
1, 4, 9, 10	varios alimentos	LC-MS/MS (QqQ, APCI, MRM)	SynChropak SCD- 100 (5µm, 250x4,6 mm)	50 mM AcONH <sub>4</sub> pH 5/ACN (75:25), 1 mL/min	(Holder <i>et al.</i> , 1997)
1, 2, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	extracto de ternera	LC-MS (Q, APCI, SIM)	TSKgel ODS 80 TM (5µm, 4,6x250 mm)	50 mM AcONH <sub>4</sub> pH 5,7/ACN, grad., 1 mL/min	(Pais <i>et al.</i> , 1997a)
1, 2, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	extracto de ternera	LC-MS (QqQ, ESI, SIM)	Hypersil BDS C18 (5µm, 250x1 mm)	5 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,5/ACN, grad., 50 µL/min	(Pais <i>et al.</i> , 1997b)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 17	vino	LC-MS/MS (QqQ, ESI, MRM)	LiChrospher 60-RP select B (5µm, 100x2mm)	0,05 % TFA en H <sub>2</sub> O/MeOH/ACN, grad., 200 µL/min	(Richling <i>et al.</i> , 1997)



1, 4, 5, 9	pollo	LC-MS (QqQ, ESI)	Zorbax C18-BD (100x1 mm)	MeOH/0,1 % AcOH, grad., 50 $\mu$ L/min	(Salmon <i>et al.</i> , 1997)
1, 2, 4, 6, 9, 14, 15	aroma	LC-MS (QqQ, APCI, SIM)	TSKgel ODS 80 TM (5 $\mu$ m, 4,6x250 mm)	0,15 % HCOOH /15 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,1/ACN, grad., 0,6 mL/min	(Stavric <i>et al.</i> , 1997b)
1, 2, 4, 6, 9, 14, 15	embutidos	LC-MS (QqQ, APCI, SIM)	TSKgel ODS 80 TM (5 $\mu$ m, 4,6x250 mm)	0,15 % HCOOH /15 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,1/ACN, grad., 0,6 mL/min	(Stavric <i>et al.</i> , 1997a)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 16, 17	varios alimentos	LC-MS/MS (QqQ, ESI, MRM)	LiChrospher 60-RP select B (5 $\mu$ m, 100x2mm)	0,05 % TFA en H <sub>2</sub> O/MeOH/ACN, grad., 200 $\mu$ L/min	(Richling <i>et al.</i> , 1998)
1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 15, 16, 17	ternera	LC-MS (Q, ESI, SIM)	Supelcosil LC-CN (3 $\mu$ m, 4,6x330 mm)	0,1 M AcONH <sub>4</sub> pH 7/ACN/MeOH (85:12:3), grad., 0,2-0,8 mL/min	(Kataoka <i>et al.</i> , 1999)
9	orina	LC-MS (Q, ESI, SIM) y LC-MS/MS (QqQ, ESI, MRM)	Vydac C18 (5 $\mu$ m, 150x1 mm)	40 $\mu$ M AcONH <sub>4</sub> pH 4/MeOH, grad., 50 $\mu$ L/min	(Kidd <i>et al.</i> , 1999)
9-DNA		LC-MS (QqQ, ESI, SIM)	HiChrom RPB (100x2,1 mm)	0,04 % HFBA en H <sub>2</sub> O/ACN (3:2), 70 $\mu$ L/min	(Crosbie <i>et al.</i> , 2000)
1, 4, 5, 6, 9	extracto de carne, bacon	LC-MS/MS (QqQ, APCI, MRM)	Vydac C18 (5 $\mu$ m, 250x2,1)	25 mM AcONH <sub>4</sub> pH 8,5/ACN, grad., 0,2 mL/min	(Guy <i>et al.</i> , 2000)
4, 5, 8, TMIP, 9, IFP	sistema modelo	LC-MS/MS (IT, ESI, PIS)	ODS-A (250x3 mm)	AcOH/ACN/MeOH, grad., 200 $\mu$ L/min	(Pais <i>et al.</i> , 2000b)
1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 14, 15	extracto de carne liofilizado	LC-MS (IT, APCI, FS)	TSKgel ODS 80 TM (5 $\mu$ m, 4,6x250 mm)	HCOONH <sub>4</sub> pH 3,25/ HCOONH <sub>4</sub> pH 3,7/ACN, grad., 1 mL/min	(Toribio <i>et al.</i> , 2000b) (Toribio <i>et al.</i> , 2000a)
4, 9, 10, 12, 17	leche humana	LC-MS (QqQ, ESI, SIM)	Symmetry Shield RP18 (3,5 $\mu$ m, 100x2,1 mm)		(De Bruin <i>et al.</i> , 2001)
1-DNA		LC-MS/MS (QqQ, $\mu$ ESI, MRM)	Nucleosil (5 $\mu$ m, 70x0,075 mm)	0,05 % AcOH/MeOH, grad.	(Gangl <i>et al.</i> , 2001)
9 y metabolitos	orina	LC-MS/MS (IT, ESI, PIS)	YMC ODS-A (250x3 mm)	AcOH/H <sub>2</sub> O/MeOH, grad., 200 $\mu$ L/min	(Knize <i>et al.</i> , 2001)
9	microsomos	LC-MS (IT, ESI, SIM)	Supelcosil C18 (750x2,1 mm)	0,5 mM AcONH <sub>4</sub> pH 3,5/ MeOH/ THF, grad., 0,1 mL/min	(Prabhu <i>et al.</i> , 2001)
1-DNA		LC-MS/MS (QqQ, $\mu$ ESI, MRM)	Nucleosil ODS (5 $\mu$ m, 765x0,075 mm)		(Soglia <i>et al.</i> , 2001)
1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, 15, IFP	pollo	LC-MS (IT, ESI, SIM)	Zorbax SB-C8 StableBond (5 $\mu$ m, 150x4,6 mm)	AcOH pH 3,5/ACN, grad., 1 mL/min	(Bang <i>et al.</i> , 2002)
9 y metabolitos	orina y heces	LC-MS/MS (IT, ESI, PIS)	Zorbax SB-C3 (5 $\mu$ m, 150x3 mm)	0,01 % HCOOH/ACN, grad., 0,4 mL/min	(Frandsen <i>et al.</i> , 2002)
10, 11 y metabolitos	microsomos hepáticos	LC-MS/MS (IT, ESI, PIS)	Zorbax SB-C3 (5 $\mu$ m, 150x3 mm)	1 % HCOOH/ACN, grad., 0,4 mL/min	(Frederiksen <i>et al.</i> , 2002)
4-DNA		LC-MS/MS (QqQ, ESI, MRM)	Cromsil ODS4HE (3 $\mu$ m, 1x50 mm)	0,01 % AcOH en H <sub>2</sub> O/ACN, grad., 50 $\mu$ L/min	(Paehler <i>et al.</i> , 2002)
1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	extracto de carne liofilizado	LC-MS/MS (IT, APCI, PIS)	TSKgel ODS 80 TM (5 $\mu$ m, 4,6x250 mm)	HCOONH <sub>4</sub> pH 3,25/ HCOONH <sub>4</sub> pH 3,7/ACN, grad., 1 mL/min	(Toribio <i>et al.</i> , 2002)

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhIP, 10: A $\alpha$ C, 11: MeA $\alpha$ C, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

Al igual que en el caso de los análisis mediante LC-UV, LC-ED y LC-FD, las separaciones cromatográficas para la determinación de HAs por LC-MS se han realizado en fase invertida, con fases móviles consistentes en MeOH y/o acetonitrilo y tampones acuosos de sales volátiles, a pH generalmente ácido, y fases estacionarias apolares. La dimensión de la columna y el flujo de trabajo ha estado principalmente restringida por el tipo de fuente de ionización. La ionización por termopulverización (TSP) o por ionización química a presión atmosférica (APCI) es compatible con el uso de columnas convencionales a un flujo de aproximadamente 1 mL min<sup>-1</sup>. En cambio, la ionización por electropulverización (ESI) requiere flujos de fase móvil bajos, por lo que la separación

cromatográfica debe realizarse con columnas de diámetro interno pequeño, o en el caso de utilizar columnas convencionales se debe introducir en el MS sólo una parte del efluente.

Los primeros trabajos relacionados con el análisis de HAs por LC-MS aparecidos en la literatura utilizaban ionización por TSP y espectrómetros de masas cuadrupolares. En estos casos, los espectros de masas obtenidos en estas condiciones proporcionaban mayoritariamente el ion molecular protonado  $[M+H]^+$ , el cual podía ser directamente utilizado para la cuantificación (Edmons *et al.*, 1986; Milon *et al.*, 1987; Turesky *et al.*, 1988) o bien como precursor en experimentos de tándem (Gross *et al.*, 1993). Más tarde, la ionización por TSP fue sustituida por las más robustas fuentes de ionización a presión atmosférica (API), bien por *electrospray* (ESI) o química (APCI). Las técnicas de ionización API, al igual que la TSP, proporcionan espectros con poca fragmentación, por lo que el pico base de las HAs corresponde al ion molecular protonado  $[M+H]^+$ . La mayoría de referencias describen el uso de instrumentos de cuadrupolo dotados de una fuente ESI, y realizan la adquisición en modo MS (Johansson *et al.*, 1995a; Galceran *et al.*, 1996a; Fay *et al.*, 1997; Pais *et al.*, 1997b; Kataoka *et al.*, 1999; Kidd *et al.*, 1999; Crosbie *et al.*, 2000; De Bruin *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 2002) o tándem MS/MS (Richling *et al.*, 1996; Richling *et al.*, 1997; Salmon *et al.*, 1997; Richling *et al.*, 1998; Kidd *et al.*, 1999; Gangl *et al.*, 2001; Soglia *et al.*, 2001; Paehler *et al.*, 2002). En la mayor parte de estos trabajos, las columnas analíticas tienen entre 1 y 3 mm de diámetro interno, por lo que el flujo de trabajo oscila entre 50 y 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ . En otras dos publicaciones (Gangl *et al.*, 2001; Soglia *et al.*, 2001), se utilizan capilares de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno rellenos, que trabajan a pocos  $\mu\text{L min}^{-1}$ . En el resto de casos (Johansson *et al.*, 1995a; Fay *et al.*, 1997; Kataoka *et al.*, 1999; Bang *et al.*, 2002) la columnas utilizadas son de 4,6 mm de diámetro interno, por lo que el flujo de trabajo es aproximadamente de 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

En otros trabajos, los instrumentos empleados son también cuadrupolares, pero el acoplamiento se realiza con una fuente APCI. La adquisición se lleva a cabo en modo MS (Pais *et al.*, 1997a; Stavric *et al.*, 1997a; Stavric *et al.*, 1997b) o MS/MS (Holder *et al.*, 1997; Guy *et al.*, 2000). Las columnas analíticas utilizadas han sido mayoritariamente de 4,6 mm de diámetro interno, con un flujo de trabajo de aproximadamente 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Sólo en un caso se ha descrito el uso de una columna de 2 mm de diámetro interno (Guy *et al.*, 2000), consistiendo la fase móvil en un tampón de acetato de amonio y acetonitrilo a 200  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

Por último, hay un reducido número de publicaciones que utilizan instrumentos de trampa iónica, bien con ESI en modo MS (Prabhu *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 2002) o MS/MS (Pais *et al.*, 2000b; Knize *et al.*, 2001; Frederiksen *et al.*, 2002), o con APCI en modo MS (Toribio *et al.*, 2000b) o MS/MS (Toribio *et al.*, 2002). De manera similar a los instrumentos de uno o tres cuadrupolos, las dimensiones internas de la columna analítica han sido de entre 2 y 3 mm en el caso de ionización ESI, con un flujo de fase móvil de 100-400  $\mu\text{L}/\text{min}$ , y de 4,6 mm para APCI, siendo en este caso el flujo 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Los límites de detección indicados en la bibliografía para disoluciones estándar son muy variados, ya que no sólo dependen del diseño instrumental sino de la fuente de ionización y otras condiciones experimentales como la fase móvil, el tipo de columna o los parámetros de adquisición entre otros. Por ejemplo, en la referencia (Galceran *et al.*, 1996a), los LODs en LC-ESI-MS para algunos analitos eran 5,4-7,9 pg inyectados, mientras que en otro trabajo de los mismos autores y en condiciones similares son de 0,5-2 pg (Pais *et al.*, 1997b). La única diferencia entre los dos trabajos es que en el segundo la columna utilizada es desactivada para bases, lo que favorece un estrechamiento de los picos cromatográficos. En otro trabajo (Kataoka *et al.*, 1999), los LODs en LC-ESI-MS son entre 6,3 y 94 pg inyectados, mientras que los LODs obtenidos mediante LC-ESI-MS/MS (Richling *et al.*, 1996), los valores oscilan entre 0,5 y 25 pg, excepto para Glu-P-2. La obtención de valores más bajos en modo MS/MS es explicable gracias a la mayor selectividad del modo de trabajo en tándem. En el caso de la fuente de ionización APCI, los valores de LODs descritos en MS para un instrumento de cuadrupolo oscilan alrededor de 10-100 pg inyectados, excepto para MeIQx, 4,8-DiMeIQx y PhIP cuyos límites son mayores (180-671 pg inyectados) (Pais *et al.*, 1997a). Expresados en términos de concentración, estos valores no difieren significativamente de los obtenidos con la fuente de ionización de ESI.

Al analizar muestras reales, los LODs no sólo están influidos por el sistema analítico, sino por la complejidad de la muestra. Por ejemplo, Stavric y sus colaboradores obtuvieron para el análisis de embutidos mediante LC-APCI-MS unos límites de detección de 0,6-1  $\text{ng/g}$  (Stavric *et al.*, 1997a), mientras que para muestras más complejas como aromas los valores fueron de 1-3  $\text{ng g}^{-1}$  (Stavric *et al.*, 1997b). Otros valores descritos en la bibliografía corresponden al análisis de un extracto de carne por LC-APCI-MS (0,2-1,4  $\text{ng g}^{-1}$ ) (Pais *et al.*, 1997a) o por LC-ESI-MS (0,1-2,3  $\text{ng g}^{-1}$ ) (Pais *et al.*, 1997b). Al utilizar modo MS/MS, los LODs disminuyen considerablemente, ya que el ruido químico filtrado

es mucho mayor que en el caso de patrones. Por ejemplo, en el caso de muestras como carne o pescado cocinado, se pueden detectar HAs a niveles de 0,01-0,05 ng g<sup>-1</sup>, usando tanto ESI (Richling *et al.*, 1998) como APCI (Guy *et al.*, 2000).

### 1.2.2.3. Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases (GC) ha sido ampliamente utilizada para el análisis de aminas por su alto poder de resolución y su bajo coste. Sin embargo, las HAs son compuestos polares y poco volátiles, y se adsorben bien en la columna o en el inyector. Por tanto, previo al análisis debe realizarse una etapa de derivatización, enfocada no sólo a reducir la polaridad de los compuestos sino también para aumentar su volatilidad y mejorar la separación cromatográfica. Algunos de los trabajos publicados relacionados con el análisis de HAs mediante GC se recopilan en la Tabla 1.12.

De entre todos los trabajos publicados basados en el uso de la cromatografía de gases como técnica de separación, sólo un autor propone utilizar el detector selectivo de nitrógeno y fósforo (NPD) como una alternativa a la MS (Kataoka *et al.*, 1997; Kataoka *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 2000). En estos artículos, la derivatización se realiza con N,N-dimetilformamidimetilacetil (N,N-DMFDA) para formar los derivados dimetilaminometileno de las HAs. El resto de publicaciones utilizan GC-MS para el análisis de las HAs, ya que esta técnica combina la eficacia de GC con la especificidad y sensibilidad de la MS. Varios trabajos utilizan la ionización electrónica (EI) para dar lugar a espectros de fragmentación característicos, utilizables para la confirmación de los analitos o para su cuantificación (Vainiotalo *et al.*, 1993; Kataoka *et al.*, 1997; Skog *et al.*, 1998b; Richling *et al.*, 1999; Solyakov *et al.*, 1999; Kataoka *et al.*, 2000; Janoszka *et al.*, 2001; Hegstad *et al.*, 2002). Otro método de ionización utilizado es la ionización química negativa (NICI), con amoníaco (Murray *et al.*, 1987; Murray *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1993; Turesky *et al.*, 1993; Tannenbaum *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1995b; Crosbie *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2001) o con metano (Tikkanen *et al.*, 1993; Tikkanen *et al.*, 1996; Reistad *et al.*, 1997; Stillwell *et al.*, 1999a; Friesen *et al.*, 2001).

Como puede observarse en la Tabla 1.12, entre los agentes derivatizantes utilizados se encuentran el cloruro de 3,5-bistrifluorometilbenzoilo (bis-TFMBO) (Murray *et al.*, 1987), el bromuro de 3,5-bistrifluorometilbencilo (bis-TFMB) (Murray *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 1993; Tikkanen *et al.*, 1993; Turesky *et al.*, 1993;

Vainiotalo *et al.*, 1993; Tannenbaum *et al.*, 1995; Sinha *et al.*, 1995b; Tikkanen *et al.*, 1996; Richling *et al.*, 1999; Stillwell *et al.*, 1999a; Crosbie *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 2001) y el bromuro de pentafluorobencilo (PFB) (Friesen *et al.*, 2001). Las HAs también se han derivatizado con anhídrido heptafluorobutírico (HFBA) (Murray *et al.*, 2001), con anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA) (Janoszka *et al.*, 2001) o con diazometano (Reistad *et al.*, 1997; Hegstad *et al.*, 2002). En un reciente trabajo se describe una derivatización en dos etapas, primero con HFBA y seguidamente con N,N-DMFDA (Sasaki *et al.*, 2001). Finalmente, algunos autores han llevado a cabo el análisis directo de las HAs apolares sin derivatizar (Skog *et al.*, 1998b; Solyakov *et al.*, 1999), aunque los propios autores reconocen que la vida de la columna se acorta considerablemente.

Tabla 1.12.- Métodos de análisis de HAs basados en GC.

Analitos*	Muestra	Sistema analítico	Agente deriv.	Ref.
15	varios alimentos	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Murray <i>et al.</i> , 1987)
4, 5	ternera	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Murray <i>et al.</i> , 1988)
4	orina	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Murray <i>et al.</i> , 1989; Sinha <i>et al.</i> , 1995b)
4, 5, 9		GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Murray <i>et al.</i> , 1993)
4, 5, 9	pollo, cerdo anchoa	GC-MS (NICI, CH <sub>4</sub> )	bis-TFMB	(Tikkanen <i>et al.</i> , 1993; Tikkanen <i>et al.</i> , 1996)
1, 4	orina	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Turesky <i>et al.</i> , 1993)
4, 5	humo de cocinado	GC-MS (EI)	bis-TFMB	(Vainiotalo <i>et al.</i> , 1993)
4 y metabolitos	orina	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Tannenbaum <i>et al.</i> , 1995)
1, 2, 4, 5, 9, 10, 14, 15, 16, 17	disolución de patrones	A) GC-NPD B) GC-MS (EI)	N,N-DMFDA	(Kataoka <i>et al.</i> , 1997)
4, 5, 9, 4'-OH-PhIP	orina	GC-MS (NICI, CH <sub>4</sub> )	diazometano	(Reistad <i>et al.</i> , 1997)
1, 2, 4, 5, 9, 10, 14, 15, 16	aerosoles de combustión	GC-NPD	N,N-DMFDA	(Kataoka <i>et al.</i> , 1998)
10, 11, 12, 13, 14, 15	varios alimentos	GC-MS (EI)	Sin derivatización	(Skog <i>et al.</i> , 1998b)
1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 16, 17	varios alimentos	GC-MS (EI)	bis-TFMB	(Richling <i>et al.</i> , 1999)
10, 11, 12, 13, 14, 15	aromas, concentrados de carne, residuos de sartén	GC-MS (EI)	Sin derivatización	(Solyakov <i>et al.</i> , 1999)
2-OH-MeIQx	orina	GC-MS (NICI, CH <sub>4</sub> )	bis-TFMB	(Stillwell <i>et al.</i> , 1999a)
9-DNA		GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	bis-TFMB	(Crosbie <i>et al.</i> , 2000)
1, 2, 5, 6, 9, 10, 14, 15, 16	agua de río	A) GC-NPD B) GC-MS (EI)	N,N-DMFDA	(Kataoka <i>et al.</i> , 2000)
9	orina	GC-MS (NICI, CH <sub>4</sub> )	PFB	(Friesen <i>et al.</i> , 2001)
1, 2, 4, 5, 9	cerdo	GC-MS (EI)	PFPA	(Janoszka <i>et al.</i> , 2001)
A) 4, 9	A) ternera y orina	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	A) bis-TFMB	(Murray <i>et al.</i> , 2001)
B) 9-DNA	B) tejidos		B) HFBA	
1, 9, 15, 16, 17	humo de cigarro	GC-MS (NICI, NH <sub>3</sub> )	HFBA+ N,N- DMFDA	(Sasaki <i>et al.</i> , 2001)
9	pelo	GC-MS (EI)	diazometano	(Hegstad <i>et al.</i> , 2002)

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhIP, 10: AαC, 11: MeAαC, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

Los métodos basados en la cromatografía de gases han demostrado ser altamente sensibles, con LODs del orden de 2-15 pg inyectados para la detección mediante NPD (Kataoka *et al.*, 1997) y de 0,1-1 pg inyectados para la detección mediante MS (Murray *et al.*, 1988). En el caso de no derivatizar los analitos, los LODs aumentan hasta 100-2000 pg inyectados (Skog *et al.*, 1998b). Para muestras reales, las HAs se detectan a partir de

0,025-0,25 ng g<sup>-1</sup> en alimentos cocinados (Murray *et al.*, 1993; Tikkanen *et al.*, 1993; Tikkanen *et al.*, 1996), de 1-10 ng g<sup>-1</sup> en el caso de aromas (Richling *et al.*, 1999), de 18 pg g<sup>-1</sup> en aerosoles (Kataoka *et al.*, 1998), de 1 pg mL<sup>-1</sup> en orina (Friesen *et al.*, 2001) y de 0,1 ng cigarrillo<sup>-1</sup> al analizar humo de tabaco (Sasaki *et al.*, 2001).

#### 1.2.2.4. Electroforesis capilar (CE)

Debido a su elevada eficacia de separación (hasta 100 veces superior a la LC), la electroforesis capilar (CE) ha sido ampliamente utilizada en los últimos años en la separación de mezclas complejas. Además, el amplio intervalo de pH de trabajo, la rapidez del análisis, la fácil automatización y el bajo coste operativo hacen a la CE una alternativa interesante para el análisis de analitos cargados. En la Tabla 1.13 se recogen algunos de los artículos que aplican la CE al análisis de HAS.

Tabla 1.13.- Metodología publicada basada en CE para el análisis de HAS.

Analitos*	Muestra	Sistema analítico	Tampón	Ref.
1, iso-IQ, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	agua de lluvia	CE-UV(DAD)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50mM + ác.cítrico 20mM +NaCl 30mM+MeOH 26%, pH 2,1	(Wu <i>et al.</i> , 1995)
1, iso-IQ, 4, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	<i>otak-otak</i> (pescado)	CE-UV(DAD)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50mM +ác.cítrico 20mM +NaCl 30mM+MeOH 26%, pH 2,1	(Wu <i>et al.</i> , 1996)
9, 9-DNA		MECC-UV(DAD)	tetraborato de sodio 25 mM, pH 9,1, SDS 50 mM	(Crosbie <i>et al.</i> , 1997)
1, 2, 4, 5, 6, 16, 17	cerdo	MECC-ED	bórax 15 mM pH 9,1+CTAB 5 mM	(Olsson <i>et al.</i> , 1997)
2, 4, 9, 15, 16	extracto de ternera	CE-UV	KCl/HCl 10 mM pH 2,2	(Puignou <i>et al.</i> , 1997)
1, 4, 5, 9	ternera, salmón y extracto de carne	CE-UV(DAD)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 30 mM+MeOH 30 %+ NaCl 20 mM, pH 2,0	(Mardones <i>et al.</i> , 1998)
1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17	disolución de patrones	CE-MS (Q, ESI, SIM)	AcONH <sub>4</sub> 20 mM pH 3/MeOH (80:20)	(Zhao <i>et al.</i> , 1998)
1, 4, 5, 9, 10, 13, 15	disolución de patrones	CE-UV	A) Como ref. (Puignou <i>et al.</i> , 1997) B) Como ref. (Wu <i>et al.</i> , 1996) C) Como ref. (Olsson <i>et al.</i> , 1997) D) 2 mM β-ciclodextrina+como ref. (Wu <i>et al.</i> , 1996)	(Mendonza <i>et al.</i> , 1999)
1, 2, 4, 9, 10	disolución de patrones	CEC-UV	Varios	(Pesek <i>et al.</i> , 2002)

\* Identidad de los analitos: 1: IQ, 2: MeIQ, 3: IQx, 4: MeIQx, 5: 4,8-DiMeIQx, 6: 7,8-DiMeIQx, 7: TriMeIQx, 8: DMIP, 9: PhiP, 10: AαC, 11: MeAαC, 12: harman, 13: norharman, 14: Trp-P-1, 15: Trp-P-2, 16: Glu-P-1, 17: Glu-P-2.

Las HAS son bases débiles, por lo que su movilidad electroforética depende fuertemente del pH de trabajo. En medio ácido, las aminas se encuentran mayoritariamente en forma protonada, por lo que se obtienen mejores separaciones y electroferogramas más cortos. Por este motivo todos los trabajos que aplican la CE para el análisis de HAS utilizan medios con pH entre 2 y 3 (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996; Puignou *et al.*, 1997; Mardones *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1998; Mendonsa *et al.*, 1999). Una excepción son las

separaciones basadas en la cromatografía electrocinética capilar micelar (MECC), que consiste en la separación de las HAS en forma neutra por su diferente interacción con las agrupaciones micelares. En estos casos, por tanto, se trabaja a valores de pH alrededor de 9 (Crosbie *et al.*, 1997; Olsson *et al.*, 1997). Todas las publicaciones utilizan disoluciones salinas acuosas, algunas veces mezcladas con un 20-30 % de MeOH (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996; Mardones *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1998).

Además de aplicaciones directas del método desarrollado por el propio laboratorio, en la bibliografía se pueden encontrar trabajos cuyo objetivo es la evaluación de varios sistemas electroforéticos propuestos en la bibliografía (Mendonsa *et al.*, 1999) o el uso de capilares modificados para realizar una separación mediante electrocromatografía capilar (Pesek *et al.*, 2002).

El sistema de detección mayoritariamente empleado debido a su simplicidad ha sido la UV, bien a una única longitud de onda (Puignou *et al.*, 1997; Mendonsa *et al.*, 1999) o utilizando un detector con diodos en serie (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996; Crosbie *et al.*, 1997; Mardones *et al.*, 1998). En un artículo se utiliza detección electroquímica (Olsson *et al.*, 1997), y en otro se propone el uso de un capilar recubierto de alcohol polivinílico (PVA) para facilitar la detección por MS (Zhao *et al.*, 1998).

Los LODs de disoluciones patrón estimados mediante CE-UV se encuentran en general entre 0,2 y 2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Wu *et al.*, 1996; Mardones *et al.*, 1998), aunque en algún caso se han obtenido valores de 0,035-0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Puignou *et al.*, 1997). La detección por espectrometría de masas proporciona LODs algo inferiores, del orden de 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Zhao *et al.*, 1998), mientras que los límites alcanzados con CE-ED son de 4-12  $\text{ng mL}^{-1}$  (Olsson *et al.*, 1997). En el caso de alimentos cocinados, los LODs obtenidos con CE-UV son de 1-4  $\text{ng g}^{-1}$  (Wu *et al.*, 1996), y con CE-ED de 0,014-1  $\text{ng g}^{-1}$  (Olsson *et al.*, 1997). Para muestras más complejas como extractos de carne, los valores proporcionados por CE-UV se incrementan hasta 35-50  $\text{ng/g}$  (Puignou *et al.*, 1997).







ELSEVIER

Journal of Chromatography B, 747 (2000) 171–202

JOURNAL OF  
CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

## Review

# Separation of heteroaromatic amines in food products

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

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

### Abstract

In recent years, many studies have dealt with the role of certain heteroaromatic amines (HAs) as mutagenic compounds, and their occurrence in foodstuffs. Here we examine the determination of HAs, focusing on the analytical strategies for their extraction and preconcentration from several matrices. We summarise the properties of heteroaromatic amines and the main drawbacks involved in their analysis, and then concentrate on the separation procedures, sorbents and solvents used in the sample treatment. We discuss the requirements of the analytical techniques and the strategies most frequently followed to achieve accurate results. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Reviews; Heteroaromatic amines

### Contents

1. Introduction .....	172
1.1. Heterocyclic amines: formation, structures and toxicity .....	172
1.2. Scope of the review .....	175
2. Analytical strategies .....	175
3. Sample preparation for the analysis of HAs in foods .....	177
3.1. The search for new mutagenic HAs .....	177
3.2. Separation and quantification of HAs in foods .....	177
3.2.1. Liquid–liquid extraction .....	181
3.2.2. Column liquid chromatography .....	181
3.2.3. Solid-phase extraction .....	189
3.2.4. On-line coupling of liquid–liquid extraction and solid-phase extraction .....	189
4. Strategies for the correction of analytical results .....	196
5. Conclusions and remarks .....	197
6. Abbreviations .....	199
References .....	200

\*Corresponding author. Fax: +34-93-4021-233.

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

## 1. Introduction

### 1.1. Heterocyclic amines: formation, structures and toxicity

As many epidemiological reports have shown, diet is a key factor in cancer development [1]. Food can positively contribute to human carcinogenesis in two ways: the first is related to the presence of genotoxic chemicals as food contaminants, which can form DNA adducts, and the second involves natural food components, such as water or fat content, which can indirectly enhance the formation of mutagenic compounds in the thermal processing of foods.

In the mid 1970s, the development of a short-term assay for the determination of mutagenic activity allowed Nagao et al. to detect a high level of

mutagenicity in the charred parts of grilled beef and fish and in the smoke produced while broiling sardines [2]. After further studies, some of the compounds responsible of the mutagenic activity, identified as heterocyclic amines (HAs), were isolated from pyrolysed amino acids and proteins (amino-carbolines, named as pyrolytic HAs) [3] and from a variety of protein-rich foods, such as meat or fish, cooked by ordinary household methods (aminoimidazoazaarenes, AIAs, also named thermic HAs) [4].

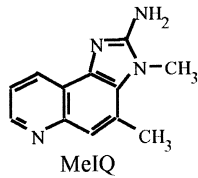
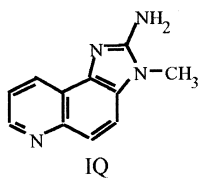
To date, more than 20 compounds included in this family have been isolated from different food samples, and most of their structures have been elucidated [5]. The corresponding names and abbreviations are given in Table 1, and structures are shown in Figs. 1 and 2.

Table 1  
Heterocyclic amines found in model systems or in cooked foods

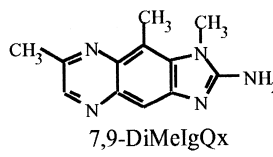
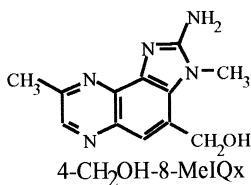
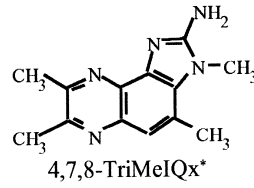
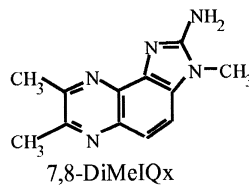
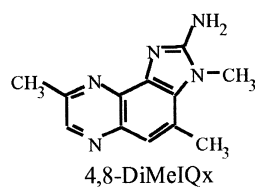
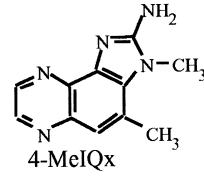
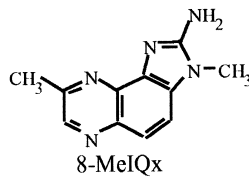
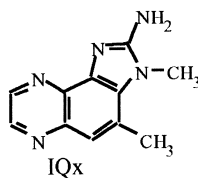
Name and classification	Abbreviation
<i>I. Aminoimidazo azaarenes</i>	
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline	IQ <sup>a</sup>
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoline	MeIQ <sup>a</sup>
2-Amino-3-methylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	IQx
2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	4-MeIQx
2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	8-MeIQx <sup>a</sup>
2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	4,8-DiMeIQx
2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	7,8-DiMeIQx
2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	TriMeIQx
2-Amino-4-hydroxymethyl-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i> ]quinoxaline	4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx
2-Amino-1,7,9-trimethylimidazo[4,5- <i>g</i> ]quinoxaline	7,9-DiMeIQx
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine	PhIP <sup>a</sup>
2-Amino-1,6-dimethylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine	DMIP
2-Amino-1,5,6-trimethylimidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine	TMIP
2-Amino-1-methyl-6-(4-hydroxyphenyl)imidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine	4'-OH-PhIP
2-Amino-1,6-dimethylfuro[3,2- <i>e</i> ]imidazo[4,5- <i>b</i> ]pyridine	IFP
<i>I. Amino-carbolines</i>	
2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indole	AαC <sup>a</sup>
2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indole	MeAαC <sup>a</sup>
1-Methyl-9 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]indole	H
9 <i>H</i> -Pyrido[4,3- <i>b</i> ]indole	NH
3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]indole	Trp-P-1 <sup>a</sup>
3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]indole	Trp-P-2 <sup>a</sup>
2-Amino-6-methyldipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazole	Glu-P-1 <sup>a</sup>
2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazole	Glu-P-2 <sup>a</sup>
2-Amino-5-phenylpyridine	Phe-P-1
4-Amino-6-methyl-1 <i>H</i> -2,5,10,10 <i>b</i> -tetraazafluoranthene	Orn-P-1
4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pyrrolo[3,4- <i>f</i> ]benzimidazole-5,7-dione	Cre-P-1
3,4-Cyclopentenopyrido[3,2- <i>a</i> ]carbazole	Lys-P-1

<sup>a</sup> Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines.

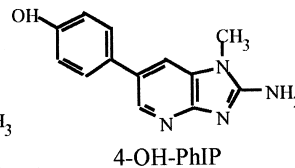
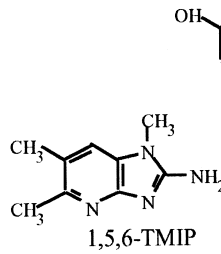
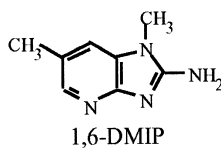
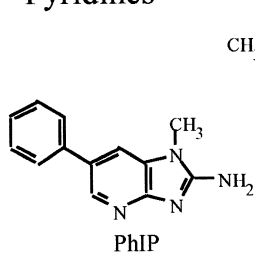
## Quinolines



## Quinoxalines



## Pyridines



## Furopyridines

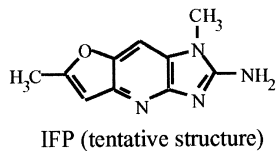
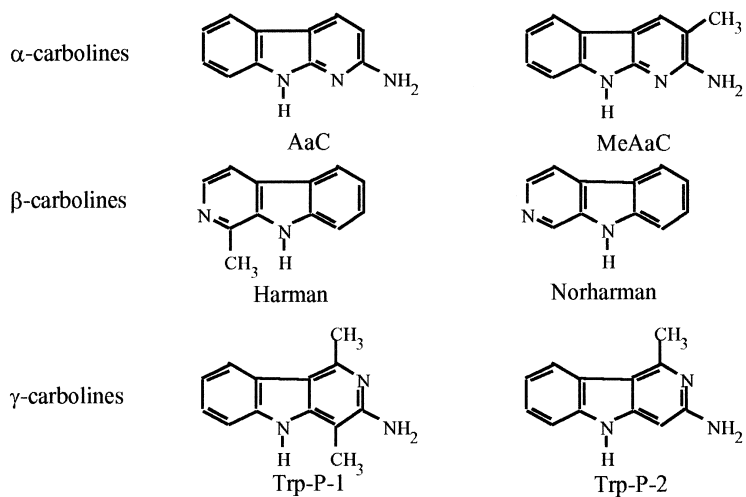
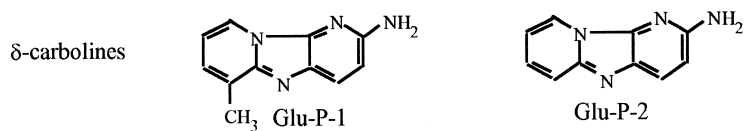


Fig. 1. Structures of the AIAs or thermic mutagens. Not reported in foods.

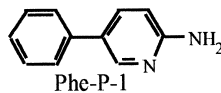
## Pyridoindole



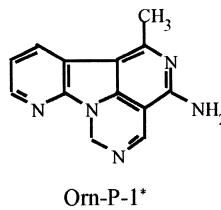
## Pyridoimidazole



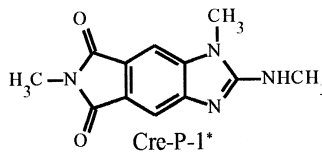
## Phenylpyridine



## Tetraazafluorantene



## Benzimidazole



## Carbazole

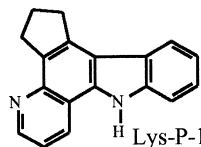


Fig. 2. Structures of the amino-carbolines or pyrolytic mutagens. Not reported in foods.

HAs have a planar, multiring aromatic structure with one or more nitrogen atoms in their ring system and an exocyclic amino group, except in the case of harman, norharman and Lys-P-1. Their formation is greatly dependent on several factors including cooking temperature and duration, concentration of precursors, presence of enhancers or inhibitors, amount of lipids or water and pH [6]. Chemical modelling has shown that, while amino-carbolines are generated via free radical reaction at temperatures generally above 300°C, AIAs are more easily formed during ordinary cooking by means of the reaction between creatinine, sugars and free amino acids, with the Maillard reaction playing an important role [7,8].

Heterocyclic amines are potent mutagens after metabolic activation when tested both *in vivo* and *in vitro* [9,10], except harman and norharman, which are not mutagenic but enhance the mutagenicity of the rest of HAs. Moreover, the 10 HAs bioassayed to date (Table 1) with long-term animal studies have been shown to be carcinogenic in rats, mice or even monkeys [11,12].

These results, together with epidemiological studies which show a certain correlation between consumption of meat and increased risk of tumour generation in humans [13,14], suggest that HAs are a potential risk factor in the aetiology of human cancer. In order to evaluate the significance of these HAs in human cancer, research is focusing on their formation, bioavailability, bio-transformation, carcinogenicity and occurrence in food [15–18]. One of the most relevant aspects is the accurate determination of the dietary intake of HAs, which requires the establishment of highly selective and sensitive analytical methodology.

The determination of HAs in foods is hindered by several factors such as their very low concentration level (ppb). Moreover, the considerable complexity of the matrix prevents an efficient clean-up and, thus, several interfering substances are present in the final extracts. Therefore, many aspects of the analysis, such as extraction, purification, chromatographic separation and detection need to be optimised.

### 1.2. Scope of the review

In recent years a number of studies have shown several aspects concerning heterocyclic amines

namely, their occurrence in food and in a general environment, their chemistry and formation of new mutagenic heteroaromatic amines and both their biological activity and potential human toxicity. Moreover, great efforts have been made to establish or improve analytical tools for the reliable determination of HAs in a variety of food samples, and the establishment standard methodology for their analysis has been attempted by means interlaboratory exercises. Many of these aspects have been summarised [11,17,19–24]. However, actual status on levels of human exposure to HAs is not well known, and reliable knowledge about these levels is mandatory for designing epidemiological studies and future risk assessments. Therefore, this review deals with some aspects of the analytical methodology necessary for the determination of HAs in foods. Primarily attention is paid on strategies for sample preparation to achieve both sample clean-up and sample concentration. Finally, procedures for the accurate quantification of HAs are surveyed in relation to the difficulties of obtaining reliable recoveries in the sample preparation.

## 2. Analytical strategies

Heteroaromatic amines can occur in a wide variety of samples, but they have been mainly found in proteinaceous foods, including cooked meat and fish and industrial origin samples like bouillon concentrates, process food flavours or meat extracts [25–27]. Furthermore, simulation systems have been developed as models for studying the mechanisms by which mutagenic amines could be generated when food is thermally processed, and also for determining the influence of various parameters in the formation of HAs [28,29]. The analytical procedures for monitoring these mutagens in both matrices, food or model systems, always require consideration of the sample matrix composition, which entails laborious analytical approaches including several steps to obtain extracts clean enough for quantification purposes.

Besides proteinaceous foods, other sources of human exposure to HAs have been studied. Thus, wine and beer have been successfully analysed in order to determine the presence of these mutagenic

substances [30,31]. In addition, some of these analytes have been detected in several environmental samples such as outdoor and indoor air, cigarette smoke, cooking fumes, rain water and incineration ash [22,32,33].

On the other hand, metabolism studies involve the analysis of biological matrices including plasma, urine, faeces or bile [34,35] in order to establish the biotransformation pathways and determine the ability of humans to metabolically activate or detoxify the procarcinogenic amines. In addition, the analysis of HAs in human urine or plasma can be used as an indicator of dietary exposure to these mutagenic compounds in daily life.

The origin of the sample to be analysed and the analytical technique selected for the determination, greatly influence the degree of purification required, and therefore the complexity of the sample preparation process, which is one of the most important steps in the analysis of heterocyclic amines. Other essential aspects of the chemical analysis are both the unequivocal identification and the accurate quantitative determination of the HAs. Before 1983, the only method applied to determine the presence and amount of mutagenic amines was the Ames/*Salmonella* test, consisting of the assay of the genotoxicity of the compounds studied in front of bacteria. In some cases, total mutagenic response was measured [36,37], while in others individual responses of various analytes were obtained [4,38]. In order to measure the mutagenicity of a single compound, it was necessary to purify the sample exhaustively and to isolate each mutagen in independent fractions by means of liquid chromatography (LC) or high-performance liquid chromatography (HPLC). Quantitative results were not accurate because the estimation of the content was based on highly purified fractions with low percentages of the initial quantity of the mutagenic substance, with a large variation in the recovery of the analyte. Therefore, this methodology was mostly applied as a preparative step for the isolation of unknown mutagens, with subsequent characterisation of the compounds by more selective techniques.

Nowadays, the determination of the HAs is commonly carried out by means of chromatographic or electrophoretic techniques using different detection systems. Gas chromatography (GC) is used for the

analysis of heterocyclic amines because of its simplicity, high resolving power and low cost. Moreover, the use of nitrogen–phosphorus detection (NPD) [39] or mass spectrometry (MS) [40,41] allows highly sensitive detection. Some of the heterocyclic amines, namely, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, H and NH, due to their low polarity can be directly analysed with GC without previous derivatisation [42]. However, most HAs are polar and non-volatile, and tend to elute as tailing peaks due to their strong adsorption to the column and injector during GC analysis. Therefore, an appropriate derivatisation procedure is required for the detection of low concentration levels.

HPLC is used to analyse HAs, because the derivatisation step required in GC is avoided and several detection systems can be used. The chemical structure of HAs provides a characteristic UV spectrum with high extinction coefficients, some amines exhibit fluorescence, and most of them can be oxidised electrochemically. Therefore, these compounds can be measured with UV detection [43,44], electrochemical detection (ED) [45,46] and fluorescence detection [29,47]. The detection method most commonly used is diode array detection (DAD) [48,49], which allows on-line identification of the analytes by spectral library matching and has a low cost. Usually fluorescence detection is used as a complement to DAD, because unavoidable interferences are frequently produced when using UV detection.

On the other hand, the improvements introduced during the last decade in the coupling of LC with MS, especially the development of modern atmospheric pressure ionisation (API) sources based on electrospray ionisation (ESI) [50,51] and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) [52,53], have allowed this technique to be successfully applied to the analysis of HAs. The mass spectrometer, a high selective, sensitive detection system, behaves essentially as a mass selector. Therefore, interference levels for a complex sample matrix are reduced when comparing with more universal detectors such as UV, and laborious isolation procedures can be reduced. In addition, a more selective detection can be carried out by means of MS–MS [54].

The separation technique most recently proposed for the analysis of HAs is capillary electrophoresis

(CE), which has higher separation efficiency and requires lower volume of solvents and sample than HPLC. Analytical methodology based on CE with UV [55], DAD [56], ED [57] or MS [58] has been successfully developed.

Other analytical procedures for the determination of HAs are based on the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) methods. Because of their high sensitivity, high selectivity and low sample preparation requirements, immunoassays attract attention of some scientists, and some monoclonal antibodies (MAbs) have been developed to carry out the analysis. However, since this method is highly specific and only a few MAbs have been synthesised, only some of the mutagenic amines, including IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx and PhIP, have been analysed by immunoassay [59,60].

### 3. Sample preparation for the analysis of HAs in foods

To assess the risk to human health derived from the daily consumption of foods containing heterocyclic amines, an accurate quantification of the amount of potential carcinogens to which man is chronically exposed is essential.

There are several factors that hinder the analysis of heterocyclic amines in foods. These analytes are present at part-per-billion levels (ng/g), which requires an optimisation of chromatographic efficiency and both detector sensitivity and selectivity. Moreover, many foods are often a complex heterogeneous mixture composed by a high number of chemical substances, therefore the accurate quantification of individual chemical compounds in this kind of samples is difficult.

#### 3.1. The search for new mutagenic HAs

As shown in Table 2, where the sample treatment for mutagenicity and characterisation studies are related in chronological order, earlier studies focused on the determination of mutagenic activity in food [61–64]. The aim of later studies was the isolation and characterisation of the compounds responsible for the mutagenicity, which were mainly present in the basic fractions [4,65–71].

In general, the procedures detailed in Table 2 have in common an initial homogenisation step, mainly carried out by adding hydrochloric acid to the sample [4,37,61,63,65,68–73]. Other solvents used are acetone [62,64], water [66,74], methanol [36] and a water–acetonitrile mixture [67].

When total mutagenic activity is measured, the procedures are very simple, based mainly on successive liquid–liquid extractions at different pH after protein precipitation [36,37,61,62,64]. A purification step with Amberlite XAD-2 is described only in two of the reviewed cases [63,73]. However, when the objective is the mutagenicity or the characterisation of a single compound, extensive fractionation is required. Thus, highly laborious procedures, which require large amounts of starting material (10–100 kg) to obtain enough mass for the analyses, have been developed. After the initial homogenisation, further purification is carried out by acid–base partition [66], LC using different sorbents [70,71,74,75] or combinations of both methodologies [4,65,67–69]. Final purification is attained by means of one or more HPLC steps, which also provide the analytes isolated in different fractions, whose genotoxicity is tested with the Ames/*Salmonella* test. The isolated mutagens are then characterised using more selective methodologies, including UV and fluorescence spectrophotometry, high-resolution MS or nuclear magnetic resonance (NMR).

#### 3.2. Separation and quantification of HAs in foods

Once a mutagenic compound has been identified and standard solutions are available, analytical-scale purification procedures and chromatographic methods for the accurate quantification of this analyte can be developed (Tables 3–5).

Sample preparation procedures before the identification and quantification of mutagenic amines have several steps. As mentioned above, the first consists of a solution step, where the sample is homogenised and dispersed using different solvents. In the cases compiled in Table 3, the solvents used are organic, such as methanol [38,76–78], acetone [9,79], ethyl acetate [3], hydro–alcoholic mixtures [80–83], or aqueous, like hydrochloric acid [30,40,41,45,59, 60,84–86], water [87,88] or sodium hydroxide [89,90]. In all the procedures (Tables 3 and 4),

Table 2  
Sample preparation methodology for mutagenic studies and isolation of new compounds

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Year	Ref.
Ground beef		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HCl, pH 2.0</li> <li>2. Add ammonium sulfate, filter</li> <li>3. LLE: wash with DCM</li> <li>4. LLE: adjust to pH 10, extract with DCM</li> <li>5. Evaporate, dissolve in DMSO</li> </ol>	Mutagenicity assay	1978	[61]
Ground beef		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acetone</li> <li>2. Filter, <math>-15^{\circ}\text{C}</math>, filter</li> <li>3. Evaporate, dilute with 0.01 M HCl</li> <li>4. LLE: wash with DCM</li> <li>5. LLE: adjust to pH 12, extract with DCM</li> <li>6. Evaporate, redissolve in DMSO</li> </ol>	Mutagenicity assay	1981	[62]
Ground beef		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HCl, pH 2</li> <li>2. Centrifuge, neutralise</li> <li>3. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone</li> <li>4. Evaporate, dissolve in DMSO</li> </ol>	Mutagenicity assay	1982	[63]
Beef extract	IQ, MeIQ, MeIQx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.1 M HCl, pH 2 saturated with NaCl</li> <li>2. Filter</li> <li>3. LLE: wash with DCM</li> <li>4. LLE: adjust to pH 12, extract with DCM</li> <li>5. LC: Silica gel+Adsorbosil-5, elute with MeOH–DCM</li> <li>6. LC: Sephadex LH-20, elute with hexane–chloroform–MeOH</li> <li>7. HPLC–UV: Ultrasil-NH<sub>2</sub>, elute with</li> <li>8. HPLC: Supelcosil LC-18, elute with MeOH–TEA phosphate (40:60)</li> <li>9. HPLC: Ultrasil-NH<sub>2</sub>, elute with CH<sub>3</sub>COOH–PrOH–hexane</li> </ol>	Mutagenicity assay MS	1983	[4]
Smoked mackerel, breaded cod sticks, fermented trout, cheese, chips, herring tid-bits, fish cake and pudding, anchovy, bread, caramel, wheatmeal buns		Same as Ref. [62]	Mutagenicity assay	1984	[64]
Ground beef	IQ, MeIQx, C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> , C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> , C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HCl, pH 2</li> <li>2. Centrifuge, neutralise, centrifuge</li> <li>3. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone</li> <li>4. LLE: adjust to pH 2, wash with DCM</li> <li>5. LLE: adjust to pH 12, extract with DCM (apolar bases)</li> <li>6. Neutralise aqueous phase</li> <li>7. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone (polar bases)</li> <li>8. Recombine 5 and 7</li> <li>9. HPLC: PRP-1 styrene–divinylbenzene, elute with 1% TEA in water–ACN</li> <li>10. HPLC–UV: Spherisorb-NH<sub>2</sub>, elute with 0.1% CH<sub>3</sub>COOH in hexane–PrOH</li> <li>11. HPLC–UV: LiChrosorb RP-18, elute with water–MeOH</li> </ol>	Mutagenicity assay MS	1984	[65]



Beef	IQ, Trp-P-2, Trp-P-1	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Boiling water</li> <li>2. LLE: adjust to pH 12, extract with DCM–MeOH (3:1)</li> <li>3. HPLC–UV: PRP-1 styrene–divinylbenzene, elute with ACN–water</li> <li>4. Ascending paper chromatography: Whatman 3MM, elute with water–BuOH–PrOH–HAc (100:100:70:1)</li> <li>5. Ascending paper chromatography: Whatman 3MM, elute with BuOH–HAc–water (12:3:5)</li> <li>6. Paper strip electrophoresis, 10% HCOOH, pH 1.5</li> <li>7. HPLC–UV: Nucleosil C<sub>18</sub>, elute with MeOH–water</li> </ol>	MS UV spectra	1985	[66]
Ground beef	PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1–9: same as Ref. [65]</li> <li>10. HPLC: PRP-1, elute with 0.1% DEA in water–MeOH</li> <li>11. HPLC: Nucleosil C<sub>18</sub>, elute with MeOH–water</li> <li>12. HPLC–UV: Lichrosorb RP-18, elute with MeOH–water</li> <li>13. HPLC–UV: Econsphere CN, elute with MeOH–water</li> </ol>	NMR MS UV spectra	1986	[68]
Egg patties	IQ	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ACN–water (10:1)</li> <li>2. Filter and evaporate, dissolve in 0.01 M HCl</li> <li>3. LLE: wash with ethyl ether</li> <li>4. Neutralise</li> <li>5. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone</li> <li>6. LC: Sephadex LH-20, elute with MeOH–DCM (3:2)</li> <li>7. HPLC: <math>\mu</math>-Spherogel, elute with ACN</li> <li>8. HPLC: PRP-1, elute with ACN–water</li> <li>9. HPLC: Spherisorb 5-NH<sub>2</sub>, elute with PrOH–hexane</li> </ol>	UV MS	1986	[67]
Beef		<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Water</li> <li>2. Centrifuge</li> <li>3. LC: blue cotton, filter and elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>4. LC: Carboxymethyl cellulose column, elute with formic acid, water and MeOH–NH<sub>3</sub> (1:1)</li> <li>5. HPLC: Nucleosil C<sub>18</sub>, elute with MeOH–HCOONH<sub>4</sub></li> </ol>	Mutagenicity assay	1986	[74]
Beef patties, hamburgers, sausages		Same as Ref. [65]	Mutagenicity assay	1988	[72]
Norwegian meat product	IQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, TMIP, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HCl, pH 2</li> <li>2. Centrifuge, neutralise</li> <li>3. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone</li> <li>4. Evaporate, dissolve in dilute HCl, pH 2</li> <li>5. LLE: extract with DCM</li> <li>6. Aqueous phase: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Neutralise</li> <li>– LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone</li> </ul> </li> <li>7. DCM extracts: <ul style="list-style-type: none"> <li>– LLE: extract with acetone</li> <li>– Evaporate, dissolve in dilute acid, pH 2</li> <li>– LLE: wash with DCM</li> <li>– Neutralise</li> <li>– LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone</li> </ul> </li> </ol>	Mutagenicity assay MS	1988	[69]

Table 2. Continued

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Year	Ref.
		8. Acetone eluates from 6 and 7: – HPLC: PRP-1, elute with ACN–water – HPLC: Nucleosil NH <sub>2</sub> , elute with PrOH–hexane – HPLC–UV: Nucleosil C <sub>18</sub> , elute with MeOH–water – HPLC–DAD: LiChrosorb CN, elute with MeOH–water			
Beef and lamb		1. MeOH 2. Filter, acidify 3. LLE: wash with diethyl ether 4. LLE: alkalise, extract with DCM 5. Evaporate to dryness and redissolve in 4 ml EtOH	Mutagenicity assay	1990	[36]
Heated reaction mixture	MeIQx, 4,8-DiMeIQx, TriMeIQx	1. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone 2. HPLC: PRP-1, elute with ACN–water 3. HPLC: Nucleosil C <sub>18</sub> , elute with 0.1% DEA in MEOH–water 4. HPLC: Nucleosil CN, elute with MeOH–water	Mutagenicity assay MS NMR	1992	[70]
Beef patties		1. 0.01 M HCl 2. Centrifuge, neutralise 3. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone 4. Evaporate, dissolve in DMSO 5. HPLC: PRP-1 PS–DVB, elute with ACN–water	Mutagenicity assay	1992	[75]
Beefburgers		Same as Ref. [63]	Mutagenicity assay	1993	[73]
Hamburgers, hot dogs		1. 0.2 M HCl 2. LLE: wash with DCM 3. LLE: alkalise, extract with DCM 4. LLE: extract with 0.2 M HCl 5. LLE: alkalise, extract with DCM 6. Evaporate, dissolve in DMSO	Mutagenicity assay	1995	[37]
Beef	4'-OH-PhIP, 4-CH <sub>2</sub> OH-8-MeIQx, 7,9-DiMeIQx	1. 0.1 M HCl 2. LC: neutralise, blue cotton, elute with NH <sub>3</sub> –MeOH (1:50) 3. Evaporate, dissolve in MeOH 4. LC: TIN-100 H05E, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (10:1) 5. HPLC: TSKgel ODS-120A 6. HPLC: TSKgel SP-2SW 7. HPLC: YMC A303 ODS	UV spectra Fluorescence spectra MS	1995	[71]

except in Refs. [85,91], where hydrochloric acid is used, sodium hydroxide is the solvent of choice, and mild heating is sometimes proposed [43,92]. In all cases, the sample treatment after the solution step often involves separation techniques such as centrifugation or filtration after protein precipitation. Further purification is carried out by one or various separation procedures including liquid–liquid extraction, column liquid chromatography, and solid-phase extraction. Moreover, a preconcentration stage is required to achieve low detection limits. This is commonly performed by evaporating the final extract to dryness and redissolving the residue in a small volume of the appropriate solvent for the determination procedure.

### 3.2.1. Liquid–liquid extraction

Liquid–liquid extraction is the separation method preferred by most of the authors for the first step in the isolation of the analytes from the food matrix. In some of the procedures summarised in Table 3, after homogenisation of the sample, elimination of the solids and change of the solvent if necessary, an acid–base partition is performed. The acidic solution obtained is directly extracted with an organic solvent, which can be DCM [9,38,40,41,77–79,84–86], diethyl ether [76] or ethyl acetate [80] in order to remove acidic or neutral interferences. If the solution obtained is basic, the analytes are directly extracted in their neutral form with DCM [30,31,45,89,90]. If the sample is homogenised in an organic solvent, the analytes are extracted with HCl [3]. In most cases, further purification is achieved by consecutive acid–base partition processes [3,9,38,40,41,76–80,84–86,89] or by combining this technique with the extraction using sorbents, which will be discussed in the following sections.

Liquid–liquid extraction can be also achieved by using inert solid materials such as diatomaceous earth, a sand-like porous material commercially available as Kieselguhr, Extrelut NT or Hydromatrix. These materials can be added to the liquid in the batch mode or more frequently as a support in a chromatographic column. In Table 3, two examples of this method are shown [89,90]. The procedure which uses diatomaceous earth is generally referred to as liquid–liquid extraction, in contrast to the solid-phase extraction, which is usually coupled on-

line to the column that contains the solid material, as described in Section 3.2.4 and Tables 4 and 5.

### 3.2.2. Column liquid chromatography

Liquid chromatography is based on a physical separation process that involves a stationary phase and a liquid mobile phase. Both the liquid solution containing the analytes and the stationary phase disposed in an adequate recipient, usually a column, are placed in contact. In general, the stationary phase interacts with the analytes allowing their selective separation and, depending on the elution conditions, liquid chromatography can be used as a semipreparative technique to collect fractions with the different compounds (Table 3). For example, in earlier works, reversed-phase HPLC was used to isolate the fraction corresponding to the analytes before quantitative analysis by HPLC–UV [38,76,77] or HPLC–fluorescence [30]. In a different case, preparative LC was used as a fractionation step, by means of an open column filled with Sephasorb HP [89]. Another chromatographic technique used for the separation of the analytes in a preparative step is thin layer chromatography, which has been applied to the isolation of IQ from ground beef [77].

When the objective is not the fractionation but the purification of the analytes, liquid chromatography is used as a clean-up step. Considering an ideal case, the compounds of interest are completely retained on the surface of the solid, the interferences are eliminated by washing the sorbent, and finally the analytes are eluted using the most appropriate solvent. In most cases, this process is performed using open columns, but sometimes the two phases are mixed in a batch with mechanical stirring, and separated by filtration after distribution equilibria are achieved.

Adsorption in resins was one of the first chromatographic mechanisms used to purify HAs. Among them, Amberlite XAD-2, a non-ionic polymeric adsorbent based on polystyrene, was the most popular (Table 3). After the corresponding treatment, the aqueous phase is neutralised and passed through the sorbent in order to concentrate the relatively non-polar chemicals. The analytes are then eluted with acetone, combined with methanol in some cases. This procedure was used in the sample treatment of beef or beef extracts to analyse some imidoazamines [81,83], or prior to immunoassay analysis [59,60].

Table 3  
Sample preparation methodology based on LLE or LC for the quantification of HAs

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Ref.
<i>Using classic LLE as purification and concentration technique</i>				
Beef extract	IQ, MeIQx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Acetone</li> <li>2. Filter, <math>-15^{\circ}\text{C}</math>, filter</li> <li>3. Evaporate, dilute with 0.01 M HCl</li> <li>4. LLE: wash with DCM</li> <li>5. LLE: adjust to pH 12, extract with DCM</li> <li>6. Evaporate, dissolve in DMSO</li> </ol>	GC-MS Mutagenicity assay	[9]
Chicken, pork, Baltic herring, meat patties	IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP	Same as Ref. [9]	Mutagenicity assay GC-MS	[79]
Meat foodstuff	MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HCl</li> <li>2. LLE: wash with DCM</li> <li>3. LLE: alkalise, extract with ethyl acetate</li> </ol>	GC-MS	[84]
Chicken	MeIQx, 4,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.25 M HCl</li> <li>2. Centrifuge</li> <li>3. LLE: wash with DCM</li> <li>4. LLE: alkalise, extract with ethyl acetate</li> </ol>	GC-MS	[41]
Hamburger, chicken breast	IQ, MeIQx, PhIP, A $\alpha$ C	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. MeOH-NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>2. Centrifuge, evaporate, dissolve in H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>3. LLE: wash with ethyl acetate</li> <li>4. LLE: adjust to pH 9.0, extract with ethyl acetate</li> <li>5. Evaporate, dissolve in mobile phase</li> </ol>	HPLC-APCI-MS-MS	[80]
<i>Using LC as purification and concentration technique</i>				
Beef	IQ, MeIQ, 8-MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.01 M HCl</li> <li>2. Neutralise</li> <li>2. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone and MeOH</li> <li>3. Dilute with water, neutralise</li> </ol>	Competition ELISA	[59]
Beef	IQ, MeIQx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. MeOH-water</li> <li>2. Centrifuge, adjust to pH 8.5</li> <li>3. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone and MeOH</li> <li>4. Evaporate, dissolve in phosphate buffer</li> <li>5. Immunoaffinity purification: monoclonal antibody column, elute with MeOH</li> <li>6. Evaporate, dissolve in buffer</li> </ol>	Mutagenicity assay HPLC-UV	[81]
Beef	PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. HCl</li> <li>2. LC: Amberlite XAD-2</li> </ol>	Competition ELISA	[60]

Beef, chicken, pork, lamb	PhIP, IQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, 1,5,6-TMIP, 3,5,6-TMIP	SCX method: 1. 0.1 M HCl–MeOH (3:2) 2. Centrifuge, acidify 3. SPE: clean with Isolute C <sub>18</sub> 4. SPE: Bond Elut SCX, elute with 1 M AcONH <sub>4</sub> , pH 8–MeOH (1:1) 5. SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> , elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 6. Evaporate, dissolve in mobile phase	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[82]
<i>Using a combination of classic LLE and LC as purification and concentration technique</i>				
Sardines	Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC, Lys-P-1	1. MeOH 2. Centrifuge and evaporate to dryness, redissolve in 1 M HCl 3. LLE: wash with diethyl ether 4. LLE: adjust to pH 10, extract with diethyl ether 5. Evaporate, dissolve in ethyl acetate 6. LC: silica gel, elute with ethyl acetate–MeOH (70:30) 7. Suspend in MeOH–HCOOH (10:90), centrifuge 8. HPLC–UV: μBondapak C <sub>18</sub> , elute with MeOH–HCOOH	Mutagenicity assay HPLC–UV	[76]
Ground beef	IQ	1. MeOH 2. Evaporate to residual water, filter 3. LLE: adjust to pH 1.5, wash with DCM 4. LLE: adjust to pH 10, extract with DCM 5. LLE: wash with 0.05 M NaHCO <sub>3</sub> 6. TLC: silica gel in MeOH–CHCl <sub>3</sub> (20:80), elute with MeOH–CHCl <sub>3</sub> (1:1) 7. HPLC–UV: LiChrosorb C <sub>18</sub> +Partisil PXS 10/25 ODS 3, elute with MeOH–0.02 M TEA, pH 3 (40:60)	HPLC–UV MS	[77]
Beef extract	IQ, MeIQx	1. Water 2. LC: blue cotton, filter and elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (50:1) 3. Evaporate, dissolve in 0.1 M HCl 4. LLE: wash with DCM 5. Evaporate aqueous layer, dissolve in MeOH–chloroform (3:7) 6. SPE: SepPak SI, elute with MeOH–chloroform 7. Evaporate, dissolve in MeOH	HPLC–ED	[87]
Beef extract	4,8-DiMeIQx	Same as Ref. [87]	HPLC–ED HPLC–DAD	[88]
Meat and fish	IQ, MeIQ	1. MeOH 2. Filter and evaporate, dissolve in 1 M HCl 3. LLE: wash with DCM 4. LLE: adjust to pH 10, extract with DCM 5. Evaporate, dissolve in water 6. LC: blue-cotton, filter and elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (50:1)	HPLC–UV LC–TSI-MS	[78]

Table 3. Continued

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Ref.
Trp pyrolysate	Trp-P-1, Trp-P-2	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ethyl acetate</li> <li>2. LLE: extract with HCl</li> <li>3. LLE: adjust to pH 10, extract with ethyl acetate</li> <li>4. LC: Silica gel, elute with ethyl acetate–MeOH–NH<sub>3</sub></li> <li>5. Evaporate, dissolve in 1 M HCl</li> <li>6. LC: blue cotton, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (49:1)</li> </ol>	LC–TSI-MS	[3]
Beef, beef extract	IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. MeOH–water</li> <li>2. Centrifuge, adjust to pH 8.5</li> <li>3. LC: Amberlite XAD-2, elute with acetone and MeOH</li> <li>4. Evaporate, dissolve in HCl, pH 2</li> <li>5. LLE: wash with ethyl acetate</li> <li>6. LLE: adjust to pH 12, extract with ethyl acetate</li> <li>7. Evaporate, dissolve in water</li> <li>8. LC: blue cotton, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>9. Evaporate, dissolve in MeOH:water (1:1)</li> </ol>	LC–TSI-MS	[83]
Beef, beef extract	IQ, MeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.4 M NaOH</li> <li>2. LLE: Extrelut, elute with DCM</li> <li>3. LLE: extract with 0.1 M HCl</li> <li>4. LLE: wash aqueous phase with DCM</li> <li>5. LLE: adjust to pH 11, extract with DCM</li> <li>6. Evaporate, dissolve in MeOH.</li> <li>7. LC: Sephasorb HP, elute with MeOH–water</li> <li>8. Evaporate, redissolve in MeOH</li> </ol>	HPLC–UV UV spectra	[89]
Beef, beef extract	IQ, MeIQ, MeIQx, TriMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, H, NH, PhIP, AαC	<p>CPC method:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1 M NaOH</li> <li>2. LLE: Extrelut, elute with DCM</li> <li>3. LC: CPC Sephasorb, elute with DCM–MeOH–NH<sub>3</sub></li> <li>4. Evaporate, redissolve in MeOH–water</li> <li>5. LC: Sephasorb HP, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>6. Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ol>	HPLC–DAD	[90]
Canned roasted eel	IQ, MeIQx, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. MeOH</li> <li>2. Filter, adjust to pH 2.5</li> <li>3. LLE: wash with DCM</li> <li>4. LLE: adjust to pH 10, extract with DCM</li> <li>5. HPLC–UV: <math>\mu</math>Bondapak C<sub>18</sub>, elute with MeOH–phosphate</li> <li>6. Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ol>	HPLC–DAD Mutagenicity assay	[38]

Beer, wine	PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1 M HCl</li> <li>2. LLE: adjust to pH 10, extract with DCM</li> <li>3. SPE: Bond Elut SI, elute with MeOH-0.1 M HCl</li> <li>4. HPLC-fluorescence: Asahipack ES-502C, elute with ammonium phosphate-ACN</li> </ol>	HPLC-fluorescence MS	[30]
Poultry meat	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.5 M HCl</li> <li>2. LLE: adjust to 9.0, extract with DCM</li> <li>3. LC: blue cotton, elute with MeOH-NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>4. LLE: alkaline, extract with DCM</li> <li>5. Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ol>	HPLC-ED HPLC-fluorescence	[45]
Lean beef	MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, 4-OH-PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.25 M HCl</li> <li>2. LLE: wash with DCM</li> <li>3. Centrifuge, alkaline</li> <li>4. LLE: extract with ethyl acetate</li> <li>5. Evaporate, dissolve in water</li> <li>6. LC: blue cotton, elute with MeOH-NH<sub>3</sub> (99:1)</li> <li>7. Evaporate, dissolve in ethyl acetate</li> </ol>	GC-MS	[40]
Wine	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. LLE: alkaline, extract with DCM</li> <li>2. SPE: Isolute PRS, elute with MeOH-NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>3. Evaporate, dissolve in water-MeOH-ACN</li> </ol>	HPLC-ESI-MS-MS	[31]
Flavours	IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.2 M HCl</li> <li>2. LLE: wash with DCM</li> <li>3. LLE: alkaline, extract with DCM</li> <li>4. LLE: extract with 0.2 M HCl</li> <li>5. LLE: alkaline, extract with DCM</li> <li>6. Evaporate, dissolve in 0.06% HCOOH-ACN (80:20)</li> <li>7. SPE: Maxi-Clean sulfobutyl-HEMA, wash with 0.1 M HCl-MeOH (4:1), elute with ACN-AcONH<sub>4</sub>, pH 9.4 (2:3)</li> <li>8. Evaporate, dissolve in mobile phase</li> </ol>	HPLC-APCI-MS	[85]
Model system	PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 0.1 M HCl</li> <li>2. LLE: wash with DCM</li> <li>3. LLE: alkaline, extract with DCM</li> <li>4. Evaporate, dissolve in MeOH-water</li> <li>5. LC: blue cotton, elute with MeOH-NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>6. Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ol>	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[86]

Table 4  
Procedures based on LLE and SPE yielding a single extract

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Ref.
Beef, beef extract	IQ, MeIQ, MeIQx, TriMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, PhIP	PRS method: 1. 1 M NaOH 2. LLE: Extrelut, elute with DCM 3. SPE: Bond Elut PRS: – Wash with 0.01 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (6:4) – Elute with 0.5 M AcONH <sub>4</sub> , pH 8 4. SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> , elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporate, dissolve in MeOH	HPLC–DAD	[90]
Beef extract	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Glu-P-1	Same as PRS method [90] washing PRS cartridge with MeOH–0.1 M HCl (4:6)	HPLC–ED	[94]
Model system	IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 4,7-DiMeIQx, 5,7-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx	Same as Ref. [94]	Mutagenicity assay HPLC–UV HPLC–DAD MS	[95]
Beef extract	IQ, MeIQ, MeIQx	Same as Ref. [94]	HPLC–ED	[96]
Meat model system	IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [94]	HPLC–UV	[44]
Meat extract	MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-2, Glu-P-1	Same as Ref. [94]	CZE–UV	[55]
Minced lean pork	IQ, MeIQ, MeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx	Same as PRS method [90], washing PRS cartridge with 0.1 M HCl	MEKC–ED	[57]
Ground beef	IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [57]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[49]
Beef flavours	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, PhIP	Same as PRS method [90] washing PRS cartridge with 0.1 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (4:6)	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[97]
Chicken, ox, pork, duck, Döner Kebab, Currywurst, chicken, Bratwurst, Schnitzel, meatball, nuggets, shish-kebab, seatrout, hamburger	IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2	Same as Ref. [97]	HPLC–ESI–MS–MS	[98]
Beefsteak, meat extract, salmon	IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [97] eluting PRS cartridge with AcONH <sub>4</sub> , pH 8.5	CZE–DAD	[99]



Fast-food meat products: hamburgers, chicken, chicken breast sandwiches, fish sandwiches, breakfast sausages	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [97], eluting Extrelut with DCM-toluene (95:5)	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[118]
Chicken	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[119]
Chicken, ground beef	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[120]
Chicken	IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence HPLC-ESI-MS	[121]
Beef, chicken, pork, lamb	PhIP, IQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, 1,5,6-TMIP, 3,5,6-TMIP	PRS method: Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[82]
Beef hamburgers, beef steaks, pork ribs, chicken	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[47]
Beef products: hamburgers, beefsteak, gravy	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[48]
Pork products: bacon, sausages, hot dogs, pork chops, ham slices	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	Same as Ref. [118]	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[122]
Round beef steak, model system	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, DMIP, 1,5,6-TMIP, IFP	Meat: Same as Ref. [118] Model system: Same as Ref. [118], substitute DCM-toluene with ethyl acetate	HPLC-DAD HPLC-fluorescence	[23]
Meat extract	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, Glu-P-2, AαC, MeAαC, H, NH	1-2. Same as PRS method [90] 3. SPE: Bond Elut PRS – Precondition with 0.1 M HCl – Wash with MeOH-water (4:6) – Elute with 0.5 M AcONH <sub>4</sub> , pH 8 4. SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> , elute with MeOH-NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporate and dissolve with MeOH	HPLC-APCI-MS	[53]

Table 4. Continued

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Ref.
Flavours	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 M NaOH, 50°C</li> <li>LLE: Extrelut, elute with DCM</li> <li>SPE: Bond Elut PRS: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Wash with 0.1 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (4:6)</li> <li>– Elute with 0.5 M AcONH<sub>4</sub>, pH 8</li> </ul> </li> <li>SPE: Bond Elut C<sub>18</sub>, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>Evaporate, dissolve in MeOH–0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1:1)</li> <li>SPE: Bond Elut SCX, elute with MeOH–1 M AcONH<sub>4</sub>, pH 8 (95:5)</li> <li>Evaporate, dissolve in MeOH–0.05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1:1)</li> </ol>	HPLC–UV HPLC–fluorescence	[43]
Beef flavour	IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 M NaOH, Kieselgur</li> <li>Soxhlet extraction of fat with diethyl ether</li> <li>LLE: elute from Kieselgur with DCM</li> <li>SPE: Bond Elut PRS: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Wash with 0.1 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (6:4)</li> <li>– Elute with 0.5 M NH<sub>4</sub>AcO, pH 8</li> </ul> </li> <li>SPE: Bond Elut C<sub>18</sub> 100 mg, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>LC: blue cotton, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>Evaporate and dissolve with MeOH</li> </ol>	HPLC–UV HPLC–DAD HPLC–fluorescence HPLC–ED	[100]
Beef	IQ, MeIQ, MeIQx, Glu-P-1, PAHs, PANHs	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 M NaOH</li> <li>LLE: Extrelut, elute with DCM (HAs, PAHs, PANHs)</li> <li>SPE: Bond Elut PRS PAHs: <ul style="list-style-type: none"> <li>4. Collect DCM, evaporate, dissolve in hexane</li> <li>5. LC: Silica gel, elute with hexane–DCM (60:40)</li> <li>6. Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ul> </li> <li>HAs: <ul style="list-style-type: none"> <li>4. Wash PRS with 0.1 M HCl, elute with 0.5 M AcONH<sub>4</sub>, pH 8</li> </ul> </li> <li>SPE: Bond Elut C<sub>18</sub>, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>Evaporate, dissolve in MeOH PANHs: <ul style="list-style-type: none"> <li>4. Elute from PRS with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> <li>5. Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ul> </li> </ol>	HPLC–UV (PAHs, PANHs) GC–MS (PAHs, PANHs) HPLC–ED (HAs) HPLC–DAD (HAs)	[101]
Beef	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 M NaOH</li> <li>LLE: Extrelut, extract with DCM</li> <li>LC: blue cotton, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (50:1)</li> <li>Evaporate, dissolve in MeOH–water</li> <li>SPE: SepPak C<sub>18</sub>, elute with MeOH–water (70:30)</li> <li>Evaporate, dissolve in MeOH</li> </ol>	HPLC–ED HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[102]

Based on the observation that HAs have a planar structure and form complexes with hemin, Hayatsu et al. developed a specific sorbent named blue-cotton [93], a cellulose cotton bearing covalently linked to copper phthalocyanine trisulfonate, which is a blue pigment. This material adsorbs very efficiently HAs in aqueous solution by means of hydrophobic interactions between the copper-phthalocyanine nucleus and the aromatic substances. Afterwards, the mutagenic amines can be easily eluted with methanol–ammonia solution, as can be seen in Table 3. The first applications developed for the analysis of HAs in food matrices introduced blue cotton directly in the aqueous solution, and the material was filtered before the elution [74,78,87]. However, the sorbent can be placed in preparative columns for the same treatment [3,40,45,83,86]. Some modified versions can be found in the literature. For example, a product called CPC Sephasorb, which consists of copper phthalocyanine bound to the dextran polymer Sephasorb HP, was developed and successfully applied to the analysis of meat extracts by Gross [90].

Other sorbents less currently used are summarised as follows. For example, Sephasorb HP, which fractionates by size exclusion and gel adsorption, was used by Gross [90] in the mentioned CPC method. As has been pointed out, this sorbent was also used by the same author to obtain different fractions by means of a preparative LC column.

Silica gel is also applied for the extraction of HAs from foods in some of the methods in Table 3. After a liquid–liquid extraction treatment, the neutralised analytes are extracted from the ethyl acetate solution by means of a column filled with the sorbent. The analytes are then eluted using ethyl acetate–MeOH [76] or ethyl acetate–MeOH–NH<sub>3</sub> [3].

The use of specific sorbents containing MAbs for the purification of heterocyclic amines provides a simple and rapid sample preparation. However, specific antibodies are needed for each compound, the synthesis of MAbs is highly complex and MAbs are not commercially available, which makes impractical this methodology. Therefore, few papers using this methodology for the extraction of HAs from food samples have been published. Among them, we find that by Turesky et al. who analysed IQ and MeIQx in beef [81] (see Table 3).

### 3.2.3. Solid-phase extraction

Solid-phase extraction (SPE) can be considered a special case of liquid chromatography, where the extraction of the analytes is performed using disposable commercial cartridges, which typically contain from 100 mg to 500 mg of a solid sorbent as stationary phase. In general, the solid phase shows a greater attraction for the analytes than the solvent in which the analytes are dissolved. As mentioned in the column liquid chromatography section, in an ideal case the compounds studied are retained in the surface of the solid, then the interferences are eliminated by washing the column and finally the analytes are eluted. Most of the solid-phase extraction procedures allow to work at microanalytical scale. Moreover, analytical sensitivity and selectivity can be optimised with the use of different sorbents and eluents and, in some cases, by coupling different sorbents in tandem. Thus, most of the sample preparation procedures apply this separation technique for the analysis of HAs, which allows one to obtain extracts purified enough to prevent interferences, and a high throughput analysis.

Some of the extraction methods described in Table 3, include isolated steps of SPE using sorbents in disposable formats such as SepPak SI [87], Bond Elut SI [30], Isolute PRS [31] or Maxi-Clean sulfobutyl-HEMA [85]. In another work [82], a coupling of three different cartridges, Isolute C<sub>18</sub>/Bond Elut SCX/Bond Elut C<sub>18</sub>, is described. Another important aspect is the possibility of coupling on-line the liquid–liquid extraction using diatomaceous earth with several SPE steps, which allows the development of tandem extraction procedures. Most of the SPE techniques are integrated in these tandem extraction procedures, which are discussed in the next section.

### 3.2.4. On-line coupling of liquid–liquid extraction and solid-phase extraction

As has been mentioned above, when liquid–liquid extraction using diatomaceous earth and solid-phase extraction are coupled, the result is a time saving and practical method suitable for multiple analyses, because few sample transfer and evaporation steps are required during the work-up. This is beneficial not only for sample handling, but also ensures high

Table 5  
Procedures based on LLE and SPE yielding two extracts

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Ref.
Meat extract, salmon	Polar amines: MeIQx, TriMeIQx, IQ, MeIQ, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, H, NH, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, IQx Non-polar amines: A $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2	1. 1 M NaOH 2. LLE: Extrelut, elute with DCM 3. SPE: Bond Elut PRS cartridge, elute with: – Non-polar amines: 0.1 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (4:6) – Polar amines: 0.5 M NH <sub>4</sub> AcO, pH 8 Non-polar amines: 4. Neutralise with NH <sub>3</sub> , dilute with water to <20% MeOH 5. SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> 500 mg, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 6. Evaporate and dissolve with MeOH Polar amines: 4. SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> 100 mg, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Evaporate and dissolve with MeOH	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[103]
Amino acids mixture	Polar amines: IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: A $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2	Same as Ref. [103]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[104]
Beef patties	Polar amines: IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: A $\alpha$ C, Trp-P-1, Trp-P-2	Same as Ref. [103]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[105] [106]
Meat extract, beef, Merguez sausage, chicken flavour paste, peanut butter	Polar amines: IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP. Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C	Same as Ref. [103]	HPLC–ESI-MS	[50]
Beef extract	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx Non-polar amines: PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, H, NH	Same as Ref. [103], but using 0.01 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (6:4) to elute apolar amines	HPLC–ED HPLC–fluorescence HPLC–DAD	[46]
Beef extract	Polar amines: IQ, PhIP Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C, PhIP	Same as Ref. [46]	HPLC–ESI-MS	[107]
Beef extract	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx Non-polar amines: H, NH, Glu-P-1, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, PhIP	Same as Ref. [46]	HPLC–ESI-MS	[51]
Beef extract	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx Non-polar amines: H, NH, Glu-P-1, Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, PhIP	Same as Ref. [46]	HPLC–APCI-MS	[52]

Bologna, summer sausage, ham, bratwurst, fresh pork sausage, Italian sausage, ground beef, eye round steak	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2	Same as Ref. [103] eluting non-polar amines with MeOH–0.1 M HCl (45:55)	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[26]
Flavour	Polar amines: MeIQx, IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2 Non-polar amines: Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, H, NH	Non-polar amines: 1–5. Same as Ref. [103] 6. LC: Fractogel TSK CM, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 7. Evaporate and dissolve with MeOH Polar amines: 1–4. Same as Ref. [103] 5. LC: Fractogel TSK CM, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 6. Evaporate and dissolve with MeOH	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[108]
Grain-food products	Polar amines: IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: AαC, Trp-P-1, Trp-P-2	Same as Ref. [108]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[109]
Turkey or chicken breast	Polar amines: MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: NH, H, Trp-P-2, Trp-P-1, AαC, MeAαC	Same as Ref. [108]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[110]
Pork chop, sliced pork belly, bacon, minute steak, sirloin steak, Falusausage, ground lean bovine meat	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, PhIP. Non-polar amines: AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2, H, NH	Meat: Same as Ref. [103] Pan residue: Same as Ref. [108], but adding 5% phenol to the 1 M NaOH and heating to 50°C	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[92]
Cod fillet, Baltic herring, chicken breast, reindeer meat, lamb chops, fillet of pork, pork stewing meat, minced beef, Prince sausage, Falu sausage, black pudding, egg	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2. Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC	Same as Ref. [92]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[111]
Reindeer, pork fillet, pork chops, pan residues, meat extracts	Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC, H, NH	Same as Ref. [92], only non-polar fraction	GC–MS	[42]
Beef steaks, beef patties, shark, bacon	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, Glu-P-1, Glu-P-2, PhIP, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx. Non-polar amines: AαC, MeAαC, Trp-P-1, Trp-P-2, H, NH	Cooked samples: Same as Ref. [103], eluting Extrelut with DCM–toluene (95:5) Grill scrapings: Same as Ref. [108], eluting Extrelut with DCM–toluene (95:5)	HPLC–DAD HPLC–fluorescence HPLC–TSI-MS	[114]
Ground beef	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: AαC, Trp-P-2,	Same as Ref. [114] for grill scrapings	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[115]
Beef, pork and a soy-based food	Polar amines: IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP Non-polar amines: AαC, Trp-P-1, Trp-P-2	Same as Ref. [115]	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[116]

Table 5. Continued

Processed sample	Compounds	Sample preparation	Analysis	Ref.
Beefburgers, pan residues	IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, H, NH	Same as Ref. [115], only polar extract, heating polar solution to 50°C For pan residues, add 5% phenol to the DCM	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[117]
Beef, chicken breast, turkey breast, pork chops, cod fish, model systems	Polar amines: IQ, MeIQ, IQx, 8-MeIQx, 4-MeIQx, 4,8-DiMeIQx, DMIP, TMIP, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, IFP. Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC	1. 1 M NaOH 2. LLE: Extrelut, elute with DCM–toluene (95:5) or ethyl acetate 3. SPE: PRS cartridge, elute with – Non-polar amines: MeOH–HCl (6:4) – Polar amines: 0.5 M NH <sub>4</sub> AcO, pH 8 4. Non-polar amines: same as Ref. [103] 5. Polar amines: – SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> , elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) – Evaporate, dissolve in MeOH–0.05 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1:1) – SPE: Bond Elut SCX, elute with MeOH–1 M AcONH <sub>4</sub> , pH 8 (95:5) – Evaporate, dissolve in MeOH–0.05 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1:1)	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[29]
Flavours	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx Non-polar amines: PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2	1. 0.2 M HCl 2. LLE: wash with DCM 3. LLE: alkalise, extract with DCM 4. LLE: extract with 0.2 M HCl 5. LLE: alkalise, extract with DCM 6. Evaporate, dissolve in 0.1 M HCl–MeOH (80:20) 7. SPE: Bond Elut PRS, elute with – Polar amines: 0.1 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (20:80) – Non-polar amines: ACN–0.5 M AcONH <sub>4</sub> , pH 8.5 (40:60) 8. Non-polar amines: – Neutralise with NH <sub>3</sub> , dilute with water to <20% MeOH – SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> 500 mg, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) – Evaporate, dissolve in mobile phase 9. Polar amines: – SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> , elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) – Evaporate, dissolve in mobile phase	HPLC–APCI-MS	[85]
Pre-processed meat cuts	Polar amines: IQ, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, TriMeIQx Non-polar amines: PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2	Same as Ref. [85]	HPLC–APCI-MS	[91]
Chicken legs	IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, AαC, MeAαC, TriMeIQx, H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2	1. 1 M NaOH 2. LLE: Extrelut, extract with DCM centrifuging 3. SPE: Bond Elut PRS, elute with – Non-polar amines: 0.1 M HCl and MeOH–HCl (45:55) – Polar amines: 0.5 M NH <sub>4</sub> AcO, pH 8 4. Non-polar amines: – Neutralise with NH <sub>3</sub> , dilute with water to <20% MeOH – SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> 500 mg, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 5. Polar amines: – SPE: Bond Elut C <sub>18</sub> 100 mg, elute with MeOH–NH <sub>3</sub> (9:1) 6. Recombine polar and apolar extracts, evaporate and dissolve with MeOH	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[112]

Flavours, flavour ingredients, bouillon concentrates, pan residue	Polar amines: IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, PhIP. Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC	<p>Mode A</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1 M NaOH</li> <li>2. LLE: Extrelut, extract with DCM–toluene (95:5)</li> <li>3. SPE: Bond Elut PRS, elute with: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Non-polar amines: 0.1 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (40:60)</li> <li>– Polar amines: 0.5 M NH<sub>4</sub>AcO, pH 8</li> </ul> </li> <li>4. Non-polar amines: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Neutralise with NH<sub>3</sub>, dilute with water to &lt;20% MeOH</li> <li>– SPE: Bond Elut C<sub>18</sub> 500 mg, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> </ul> </li> <li>5. Polar amines: <ul style="list-style-type: none"> <li>– SPE: Bond Elut C<sub>18</sub> 100 mg, elute with MeOH–NH<sub>3</sub> (9:1)</li> </ul> </li> <li>6. Recombine polar and apolar extracts, evaporate and dissolve with MeOH–AcONH<sub>4</sub>, pH 6</li> <li>7. SPE: Isolute CBA, elute with MeOH–NH<sub>3</sub></li> <li>8. Evaporate and dissolve with MeOH</li> </ol> <p>Mode B (more complex samples) Same as Mode A, treating per separate polar and apolar extracts with CBA cartridge</p>	HPLC–DAD HPLC–fluorescence GC–MS	[27]
Meat juice model system	Polar amines: IQ, MeIQ, IQx, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP. Non-polar amines: H, NH, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC	<p>Normal samples:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 4 M urea, 1 M NaOH</li> <li>2. LLE: Extrelut, elute with DCM</li> <li>3. SPE: Bond Elut PRS, elute with: <ul style="list-style-type: none"> <li>– Non-polar amines: 0.01 M HCl and MeOH–0.1 M HCl (4:6)</li> <li>– Polar amines: 0.5 M NH<sub>4</sub>AcO, pH 8</li> </ul> </li> <li>4. Non-polar amines: same as Ref. [103]</li> <li>5. Polar amines: same as Ref. [103]</li> </ol> <p>More complex samples: Same as Ref. [27]</p>	HPLC–DAD HPLC–fluorescence	[28]

analyte recovery. Moreover, the high number of commercial stationary phases and the possible optimisation of each step by changing the working solvents, greatly enhances both the selectivity and the quantativity of these tandem methods. Therefore, they can be regarded as standard procedures, although their suitability for the chromatographic analysis of a given sample depends on both the selectivity of the detection technique and the sample matrix. Some examples of the methods based on LLE–SPE tandem proposed in the bibliography are summarised in Tables 4 and 5. Table 4 includes sample preparation procedures that lead to a single extract, while Table 5 refers to the procedures that yield two extracts.

Diatomaceous earth are coupled to the SPE by disposing the solid material in an empty preparative column, which is also commercially available. The use of diatomaceous earth as solid support for liquid–liquid extraction is recommended for the sample preparation of aqueous samples, and can be used within the pH range 1–13. When this material is mixed with the sample, which has been previously homogenised in sodium hydroxide solution, the aqueous phase is distributed itself in the form of a thin film over the chemically inert matrix. Subsequently, HAs are eluted using organic solvents that are non-miscible with water, therefore this process could be considered as a liquid–liquid chromatography. When diatomaceous earth are used for the liquid–liquid extraction, lipophilic substances are extracted from the aqueous into the organic phase, and macromolecules like proteins and carbohydrates remain adsorbed on the inert material. In comparison with the classic liquid–liquid extractions, the advantages of this methodology are that emulsions are avoided, the process is faster and less solvent is required.

Currently, the solvents most commonly used as mobile phase are dichloromethane (DCM) [26,28,42–44,46,49–53,55,57,90,92,94–112] and ethyl acetate [23,29]. Moreover, Gross and Fay [113] observed that the elution from diatomaceous earth was improved by adding 5% toluene or phenol to dichloromethane. Several studies have applied this improvement [23,27–29,47,48,82,114–122].

Hitherto, the most popular tandem method is the proposed by Gross in 1990 [90], and consists of the

combination of diatomaceous earth with propylsulfonate silica (PRS cartridge). The sample homogenised with 1 *M* sodium hydroxide is loaded in an Extrelut column, which is coupled to a PRS cartridge. The analytes are then transferred from the diatomaceous earth to the cationic exchanger sorbent by passing DCM, DCM with additives or ethyl acetate through the tandem. To activate the ion-exchange process, 0.01 *M* hydrochloric acid is passed by the PRS sorbent, and the cartridge is then washed with a methanol–hydrochloric acid (MeOH–0.1 *M* HCl, 6:4) solution. The analytes are then eluted with ammonium acetate, pH 8 and retained in a C<sub>18</sub> cartridge, in order to achieve a preconcentration prior to chromatography. The scheme of this method is shown in Table 4, together with the rest of procedures which also obtain a single extract after the sample preparation. The main modifications of the original method are the increase in the hydrochloric acid concentration from 0.01 *M* to 0.1 *M* [49,57], in order to raise the ionic activation, or the change in the MeOH–water ratio from (6:4) to (4:6) [44,55,94–96], to minimise the elution of the analytes during the washing step. Some methods [23,47,48,82,97–99,118–122] include both modifications. Other methods change the ammonium acetate [99]. Thus, in this work the eluting solvent is adjusted to pH 8.5. Moreover, in order to avoid the losses of the analytes during the washing step of PRS with hydrochloric acid, acidic preconditioning before the sample treatment has been proposed [53]. This same group of scientist made some minor modifications to the tandem proposed by Gross and Grüter for analysing different families of compounds, namely HAs, PAHs and PANHs [101]. The PRS extraction method shows its limitations when more complex samples, such as process flavours, bouillon concentrates or pan residues, are analysed by UV detection. Therefore, additional clean-up steps should be used to purify more efficiently these complex samples, in order to improve chromatographic efficiency and to obtain detection sensitivities similar to those obtained with heated meat products. Some examples described in Table 4 include an additional purification step using a Bond Elut SCX cartridge [43], which is a strong cation exchanger, or a blue-cotton column [100]. Finally, an alternative to the PRS method is proposed in [102], where the dichlorome-



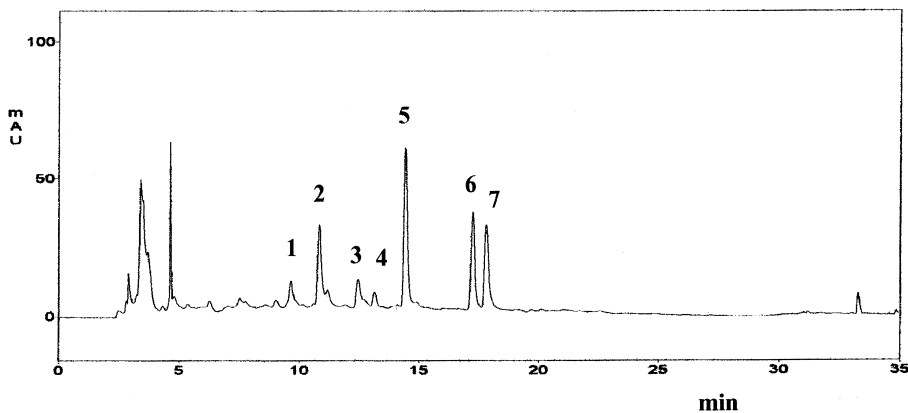
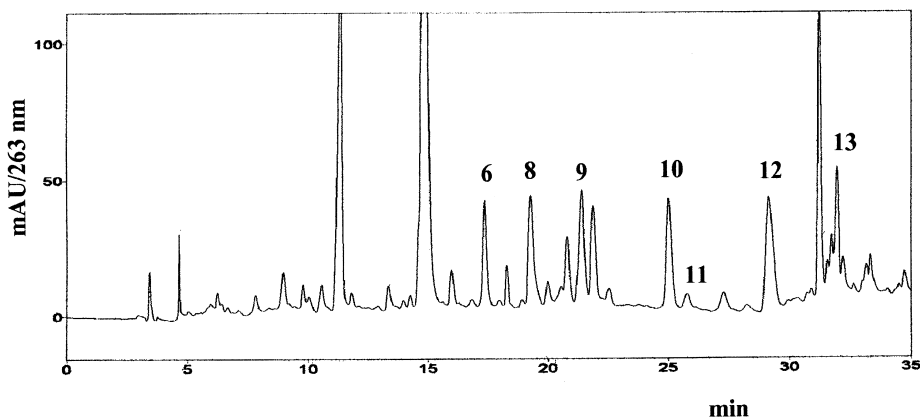
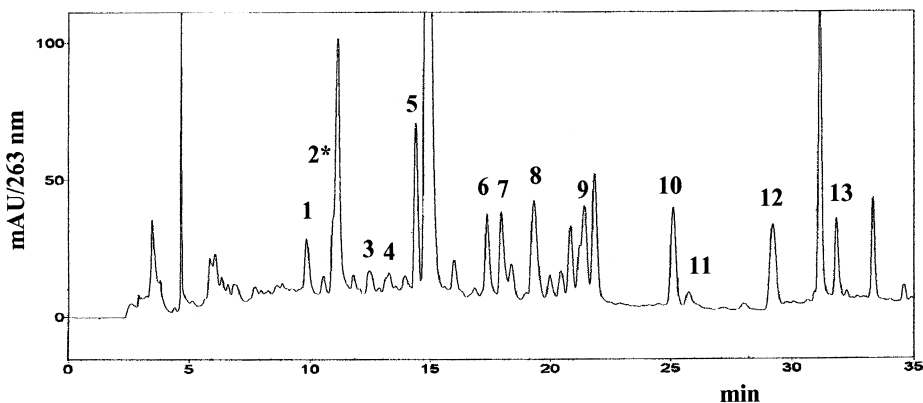
**Method described by Gross and Grüter, polar extract****Method described by Gross and Grüter, less-polar extract****Method described by Toribio et al.**

Fig. 3. Chromatograms obtained with the method described in Refs. [103] and [123]. The sample was a meat extract spiked with 100 ng/g of each amine. Peak identification: 1=Glu-P-2; 2=IQ; 3=MeIQ; 4=Glu-P-1; 5=MeIQx; 6=7,8-DiMeIQx (I.S.); 7=4,8-DiMeIQx; 8=norharman; 9=harman; 10=Trp-P-2; 11=PhIP; 12=Trp-P-1; 13=AαC. \* Non pure peak. Reproduced with permission from Ref. [123].

thane is directly introduced into a blue cotton column.

As has been stated, the acidic washing of the PRS sorbent results not only in the activation of the ionic exchange, but also in the elution of the less polar analytes (PhIP, carbolines). Another tandem was thus developed [103]. In this work, the effect of the ratio MeOH–HCl in the washing solution was tested, and it was observed that the best compromise between selectivity and recovery was obtained when 0.1 *M* hydrochloric acid containing 40–50% of methanol was used, achieving selective desorption of the less polar amines. As shown in Table 5, this tandem extraction system allowed the simultaneous analysis of most HAs present in heated meat and fish and in meat extracts [50,103–106]. On the other hand, Galceran et al. [46] studied the influence of the concentration of HCl in the rinsing step, and better results were obtained when 0.01 *M* HCl and MeOH–0.1 *M* HCl (6:4) were used in the first elution of PRS sorbent. The increase of MeOH in the solution allows the collection of PhIP in the less-polar extract [46,51,52,107]. The ratio MeOH–HCl is also changed in Refs. [26–28,85,91,112], and, in some cases, the modification implies the use of ammonium acetate pH 8.5 [85,91]. Further changes are aimed at the analysis of more complex samples, and consist of the addition of a clean-up step. In some cases, this additional step is carried out using a Fractogel TSK CM column, a weak cation-exchange gel [42,92,108–111,114–117]. By using a polymeric sorbent, the irreversible adsorption produced when silica gel is used is avoided. In other cases, Bond Elut SCX [29] or Isolute CBA [27,28], which is a weak cation exchanger consistent of propylcarboxylic acid, are used for the additional clean-up step. Other possible modifications are the recombination of the final extracts obtained [112], and the substitution of the LLE using Extrelut by a classic LLE process [85,91].

The tandem extraction procedures discussed in this section, which have been classified in two groups according to the number of extracts yielded, are the most applied procedures for the sample preparation in the quantitative analysis of HAs. In general, a compromise between high recovery and clean-up efficiency must be achieved. The choice of some of these methods for a particular analysis will depend

on the matrix sample, sensitivity required and detection technique. As an example, Fig. 3 shows the chromatograms obtained using two of the most significant methods in Tables 4 and 5, respectively. As can be seen, for polar amines a cleaner extract is obtained using the Gross and Grüter method [103] modified by Galceran et al. [46], which provides two extracts. However, the method of Toribio et al. [123] only provides a single extract, therefore this method is faster and seems suitable for the screening of unknown samples.

#### 4. Strategies for the correction of analytical results

Since analyte extraction during the sample treatment is not complete, a correction taking into account the recovery values has to be done in order to accurately quantify HAs. One option is to add an exact amount of a substance not present in the sample before the extraction, and to extrapolate the recovery of this compound to the analytes studied [41,90,95]. However, the use of a single standard is not suitable, because HAs include several classes of compounds, and significant differences in recovery values have been observed even between substances belonging to the same family. Moreover, clean-up efficiency is greatly influenced by the sample matrix and so to predict recoveries is very difficult. In this case, the most suitable method to calculate recoveries is the multiple standard addition, which is able to determine the recovery of each analyte individually. Triplicate or quadruplicate extractions with one or two samples spiked with a reference solution of standards are performed to obtain sets of concentration data for each analyte. Using the slope obtained from linear regression analysis, using the added concentration of standards ( $x$ ) as independent variable and the measured concentration ( $y$ ) as dependent variable, extraction efficiencies are calculated. Uncorrected results can be calculated as the  $y$ -axis intercept of the same linear regression, and corrected results are obtained by dividing the intercept by the slope. The analytical precision can be estimated through the standard errors of slope and intercept [103]. Some authors suggest the addition of an amount similar to the amount of analyte found in

foods, i.e., additions of 50 ng [112], 100 ng [27,90] or 250 ng of each analyte [49,103,118]. Nevertheless, in order to detect the effect of spiking level on recoveries, standard addition methods with several spiking levels, ranging from 0 to 50 ng [99,108], from 0 to 320 ng [53] and from 0 to 500 ng [46,94] have been described. When addition standard method is applied as quantification model, the risk to obtain inexact results should be considered because of an overestimation of recovery, which is more significant when the interaction between sample matrix and analyte is strong. In these cases, it is recommended to optimise the contact time between the sample and the amount spiked. On the other hand, a drawback when using the standard addition method to quantify HAs is that replicate extractions have to be performed.

When LC–MS is used, stable isotope dilution quantification, using analytes marked with [ $^2\text{H}$ ] or [ $^{13}\text{C}$ ] as internal standards, reduces the number of samples to be extracted per determination. This quantification method consists of the enrichment of the sample with the labelled compound before the extraction procedure, and the subsequent quantification by means of a calibration curve, using the same labelled analyte as internal standard. Thus, deuterated analytes [50,80,83,84,91,98] or compounds marked with [ $^{13}\text{C}$ ] [80] have been used for the quantitative determination of the respective non-marked analytes. The use of labelled internal standards for isotope dilution reduces the variability due to extraction efficiencies or changes in instrument performance and ensures the accuracy of quantification. In some cases, when not all the labelled analytes are available, one of the marked compounds can be added as internal standard for more than one analyte. For example, [ $^{13}\text{C},^{15}\text{N}$ ]MeIQx is used for the quantification of MeIQx and 4,8-DiMeIQx [40,84], [ $^2\text{H}_3$ ]PhIP can act as internal standard for PhIP and 4-OH-PhIP [40] or even for all the analytes collected in the polar fraction obtained after a clean-up procedure, while [ $^2\text{H}_4$ ]NH can be used for the non-polar compounds [31]. Recovery of the analytes can be measured by comparing labelled internal standard peak areas in extracted samples with those in non-extracted standards [84] or by spiking the sample with non-marked analytes [31,80,91,98].

Another option for determining the extraction

efficiency consists of the addition of radiolabelled analytes. By this procedure, the measurement of the radioactivity provides the recovery of the native analyte. For example, [ $^{14}\text{C}$ ]IQ and [ $^{14}\text{C}$ ]MeIQx were used to determine the recovery of IQ and MeIQx when some food samples were analysed [81,83,87].

The recoveries obtained using some of the tandem extraction procedures described in the bibliography are given in Table 6, following the same citation order as in Tables 4 and 5. As previously described, these methods are based on the coupling of diatomaceous earth with an SPE cartridge. When the tandem proposed by Gross [90] or some of the modifications which yield a single extract are applied, only the most polar compounds are recovered, except in Ref. [53], where all the HAs analysed are recovered. In contrast, when the washing solutions from PRS cartridge are collected [46,51,52,91,103,105,112] and two extracts are obtained, recoveries in general higher than 60% are achieved for both polar and non-polar analytes, even with an additional clean-up step using a CBA cartridge [27] or a Fractogel TSK CM column [108]. However, low recoveries have been observed for some carbolines [26,94,106,111]. In the case of PhIP, the extraction efficiency is low in most cases, and the recovery is hardly ever higher than 70% [43,44,53,91]. The wide range of recoveries obtained with the same method, even within laboratories [23,97,121], can result from the marked influence of sample matrix on the clean-up efficiency.

## 5. Conclusions and remarks

The extraction of heteroaromatic amines from foods is a complex task, especially when the quantification of the amines is concerned. Most of the procedures for the concentration and clean-up of the sample combine LLE and LC techniques but, so far, have not provided suitable reproducibility or accuracy for quantitative purposes. One of the main drawbacks is the unequivocal assessment of the identity of the analyte, which is hindered due to the great number of interferences present in the food sample. Furthermore, the recovery of the analytes greatly depends on the matrix of sample, which prevents the establishment of a general procedure for

Table 6  
Recoveries of different LLE–SPE sample treatment procedures

Ref.	Recovery (%)																			
	IQ	MeIQ	IQx	MeIQx	4,8-DiMeIQx	7,8-DiMeIQx	4,7,8-TriMeIQx	PhIP	Glu-P-1	Glu-P-2	Trp-P-1	Trp-P-2	AαC	MeAαC	H	NH	DMIP	1,5,6-TMIP	3,5,6-TMIP	
<i>Refs. from Table 4</i>																				
[90] PRS method	83	68		78	81	78	75	t.r.	51	70	n.r.	n.r.	n.r.		n.r.	n.r.				
[94]	68	77		63	66				18											
[96]	36	51		28																
[44]			88	92	89	88		79												
[55]		78		67																
[49]	75	75		84	73			65												
[97]	55–83	55–83		44–72	44–72			33–56	55–80	55–80										
[98]	51	19	43	80	59	79	48	22	93	138										
[99]	55–90			67–80	62–78			6–12												
[118]	55	47		68	61			30												
[121]	35–98			35–98	35–98			9–63												
[82] PRS method	45	38	95	67	72			30									6	n.r.	70	
[23]				41–83				14–67												
[53]	70	73		70	52	75		74	57	58	46	50	49	51	50	54				
[43]	90	88		83	87			88 <sup>a</sup>												
[101]	54	80		60					60											
[102]	77	69		70	61			69												
<i>Refs. from Table 5</i>																				
[103]	70	66		73	84			38	70	70										
[105]	62			71	59			46			65	69	52							
[106]	26–80			26–80	26–80			30–57			7–37	7–37	7–37							
[46]	82	99		87	78			55	81		91	74	68	70	70	73				
[51]	74	80		82	89			54	79		76	61	60	59	61	105				
[52]	72	68		83	85			50	74		64	73	58	62	68	83				
[26]	67	48		73	42			46				31			70	77				
[108]	>75	>75		>75	>75			>41	t.r.	t.r.	>75	>75	>53		>75	>75				
[92]	60			70	66			40												
[111]	66	63		68	72			20			45	37	7	25	66	57				
[42]											42	44	52	58						
[117]				71	63			66												
[91]	91	86		93		89	90	77			86	83								
[112]	74	72	73	89	69	73		52	71	74	80	68	69	69	72	75				
[27]	>70	>70	>55	>70	>70	>70		>65			>55	>65	>55	>65	>70	>70				
[28]	53–69	50–61	54–58	80–86	74–84	75–84		49–80			33–54	60–70	35–39	47–55	97–100	83–89				

<sup>a</sup> Determined before SCX cartridge.

the analysis of HAs. To date, the methods developed as tandem extraction procedures, coupling on-line several clean-up steps, have been found to be the most appropriate procedures for many samples, but could still be improved.

Since the evaluation of daily intakes of HAs requires reliable analytical methods to determine these compounds in foods cooked in the laboratory, many efforts to improve the analytical methodology should be done. Intercomparison exercises within both national or international programs should be promoted, and the preparation of certified materials would be welcome by the scientific community. Furthermore, once a standard procedure would be properly validated, representative food products should be analysed to assess the daily exposure to HAs. Regarding the standard methodology, it is important to consider the necessary compromise between high recovery, clean-up efficiency and throughput analyses, which should also be considered at the same time as the detection system is selected. If a sensitive and selective technique such as MS is available, the use of a tandem procedure including diatomaceous earth-PRS-C<sub>18</sub> allows to analyse a large group of amines in a single extract [53]. This method can be a useful choice method for screening new samples, although in some cases poorer detection limits than those obtained with standard solutions can be achieved. However, this procedure allows to perform the purification and preconcentration step with a considerable reduction in analysis time and materials. When UV detection is used, the CPC method described by Gross is also able to provide a single extract for a complete analysis of HAs, although the SPE steps are not coupled on line, and the copper phthalocyanine (CPC) sephasorb sorbent is not found as a commercial cartridge. On the other hand, the PRS tandem method previously described can be modified to yield two extracts clean enough for the determination of polar and less-polar amines groups [46,103], providing more sensitive and accurate results. In this case, UV detection, as well as other techniques such as electrochemical, fluorescence, or MS detection, can be used [46,50,51,104,106].

Another quantitation aspect of the HAs analysis, is concerned with the strategies used for the correction of analytical results by means an accurate estimation

of the recovery. The standard addition method with several spiking levels (at least three) is the most recommended procedure, although if the sample is well known, and a high throughput analysis is required, the Gross model procedure with a single spiking level (by duplicate) can be applied. The most reliable results would be obtained if the corresponding isotopic labelled compounds were available, and the isotopic dilution procedure was applied.

Undoubtedly, the analysis would be less complex if the analysis of only a few HAs was required, so that the extractions could be optimised for just a single group of amines. Thus, further studies must be carried out in order to establish occurrence, bioavailability, genotoxicity and carcinogenicity as a way to determine the amines with most significant role in human cancer development. To date, there is considerable evidence that the major subclass of HAs found in the human diet comprises the aminoimidazoazaarenes, including some of the polar amines and PhIP as well [17]. Therefore, this reduced group of amines could be analysed preferably, and the sample preparation could be more efficient and less time-consuming than that for the complete HA analysis.

## 6. Abbreviations

ACN	Acetonitrile
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
BCR	Community Bureau of Reference
CZE	Capillary zone electrophoresis
DAD	Diode array detection
DCM	Dichloromethane
DEA	Diethylamine
DMSO	Dimethylsulfoxide
ED	Electrochemical detection
ESI	Electrospray ionisation
HAs	Heteroaromatic amines
LLE	Liquid-liquid extraction
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography
NPD	Nitrogen-phosphorus detection
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PANHs	Nitrogen-containing polycyclic aromatic hydrocarbons
PS-DVB	Polystyrene-divinylbenzene

Ref.	Reference
SPE	Solid-phase extraction
TEA	Triethylamine
TLC	Thin-layer chromatography
TSI	Thermospray ionisation

## References

- [1] R. Sinha, N. Caporaso, *J. Nutr.* 129 (1999) S556.
- [2] M. Nagao, M. Honda, Y. Seino, T. Yahagi, T. Sugimura, *Cancer Lett.* 2 (1977) 221.
- [3] H. Milon, H. Bur, R.J. Turesky, *J. Chromatogr.* 394 (1987) 201.
- [4] W.A. Hargraves, M.W. Pariza, *Cancer Res.* 43 (1983) 1467.
- [5] T. Sugimura, *Mutat. Res.* 376 (1997) 211.
- [6] K. Skog, M. Johansson, M. Jägerstad, in: R.H. Adamson, J.A. Gustafsson, N. Ito, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Y. Yamazoe (Eds.), *Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation*, Princeton Scientific, Princeton, NJ, 1995, p. 9.
- [7] M. Jägerstad, A. Laser Reuterswärd, R. Öste, R. Dahlqvist, S. Grivas, J.C. Olsson, T. Nyhammar, *ACS Series* 215 (1983) 507.
- [8] K. Skog, *Food Chem. Toxicol.* 31 (1993) 655.
- [9] N. Loprieno, G. Boncristiani, G. Loprieno, *Food Chem. Toxicol.* 29 (1991) 377.
- [10] F.T. Hatch, in: R.H. Adamson, J.A. Gustafsson, N. Ito, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Y. Yamazoe (Eds.), *Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation*, Princeton Scientific, Princeton, NJ, 1995, p. 93.
- [11] K. Wakabayashi, T. Sugimura, *J. Nutr. Biochem.* 9 (1998) 604.
- [12] H. Ohgaki, S. Takayama, T. Sugimura, *Mutat. Res.* 259 (1991) 399.
- [13] W. Zheng, D.R. Gustafson, R. Sinha, J.R. Cerhan, D. Moore, C.P. Hong, K.E. Anderson, L.H. Kushi, T.A. Sellers, A.R. Folsom, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 1724.
- [14] K. Augustsson, K. Skog, M. Jägerstad, P.W. Dickman, G. Steineck, *Lancet* 353 (1999) 703.
- [15] J.S. Felton, M.A. Malfatti, M.G. Knize, C.P. Salmon, E.C. Hopmans, R.W. Wu, *Mutat. Res.* 376 (1997) 37.
- [16] K.I. Skog, M.A.E. Johansson, M.I. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 879.
- [17] H.A.J. Schut, E.G. Snyderwine, *Carcinogenesis* 20 (1999) 353.
- [18] E.G. Snyderwine, R.J. Turesky, K.W. Turteltaub, C.D. Davis, N. Sadrieh, H.A.J. Schut, M. Nagao, T. Sugimura, U.P. Thorgeirsson, R.H. Adamson, S.S. Thorgeirsson, *Mutat. Res.* 376 (1997) 203.
- [19] C. De Meester, M.T. Galceran, M. Rabache, *Chemical Analysis of Heterocyclic Amines (HAAs) in Heat Processed Food: Second Intercomparison On the Quantitative Determination of HAAs in A Commercial Sample of Beef Extract*. BCR, Report EUR 17652 EN, ECSC-EC-EAEC, Brussels, 1997.
- [20] G.A. Gross, *Quantitative Determination of Mutagenic Heterocyclic Amines in Beef Extract, Vers-chez-les-Blanc*, Lausanne, 1992.
- [21] M. Jägerstad, K. Skog, P. Arvidsson, A. Solyakov, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 419.
- [22] H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 121.
- [23] J.S. Felton, P. Pais, C.P. Salmon, M.G. Knize, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 434.
- [24] M.G. Knize, J.S. Felton, *Chromatogr. Sci. Series* 77 (1998) 93.
- [25] D.W. Layton, K.T. Bogen, M.G. Knize, F.T. Hatch, V.M. Johnson, J.S. Felton, *Carcinogenesis* 16 (1995) 39.
- [26] B.G. Abdulkarim, J.S. Smith, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4680.
- [27] A. Solyakov, K. Skog, M. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 37 (1999) 1.
- [28] P. Arvidsson, M.A.J.S. Vanboeckel, K. Skog, A. Solyakov, M. Jägerstad, *J. Food Sci.* 64 (1999) 216.
- [29] P. Pais, C.P. Salmon, M.G. Knize, J.S. Felton, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1098.
- [30] S. Manabe, H. Suzuki, O. Wada, A. Ueki, *Carcinogenesis* 14 (1993) 899.
- [31] E. Richling, C. Decker, D. Haring, M. Herderich, P. Schreier, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 71.
- [32] J. Wu, M.K. Wong, H.K. Lee, C.N. Ong, *J. Chromatogr. Sci.* 33 (1995) 712.
- [33] H. Kataoka, K. Kijima, G. Maruo, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (1998) 60.
- [34] M.A. Malfatti, K.S. Kulp, M.G. Knize, C. Davis, J.P. Massengill, S. Williams, S. Nowell, S. Macleod, K.H. Dingley, K.W. Turteltaub, N.P. Lang, J.S. Felton, *Carcinogenesis* 20 (1999) 705.
- [35] L.O. Dragsted, S. Grivas, H. Frandsen, J.C. Larsen, *Carcinogenesis* 16 (1995) 2795.
- [36] P.J. Barrington, R.S.U. Baker, A.S. Truswell, A.M. Bonin, A.J. Ryan, A.P. Pauling, *Food Chem. Toxicol.* 28 (1990) 141.
- [37] B. Stavric, T.I. Matula, R. Klassen, R.H. Downie, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 815.
- [38] H. Lee, S.-J. Tsai, *Food Chem. Toxicol.* 29 (1991) 517.
- [39] H. Kataoka, K. Kijima, *J. Chromatogr. A* 767 (1997) 187.
- [40] R. Reistad, O.J. Rosslund, K.J. Latvakala, T. Rasmussen, R. Vikse, G. Becher, J. Alexander, *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 945.
- [41] L.M. Tikkanen, K.J. Latvakala, R.L. Heinio, *Food Chem. Toxicol.* 34 (1996) 725.
- [42] K. Skog, A. Solyakov, P. Arvidsson, M. Jägerstad, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 227.
- [43] G.A. Perfetti, *J. AOAC Int.* 79 (1996) 813.
- [44] P. Arvidsson, M.A.J.S. Vanboeckel, K. Skog, M. Jägerstad, *J. Food Sci.* 62 (1997) 911.

- [45] M. Murkovic, M. Friedrich, W. Pfannhauser, Z. Lebensm. Unters. Forsch. A 205 (1997) 347.
- [46] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou, J. Chromatogr. A 719 (1996) 203.
- [47] M.G. Knize, R. Sinha, E.D. Brown, C.P. Salmon, O.A. Levander, J.S. Felton, N. Rothman, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4648.
- [48] R. Sinha, N. Rothman, C.P. Salmon, M.G. Knize, E.D. Brown, C.A. Swanson, D. Rhodes, S. Rossi, J.S. Felton, O.A. Levander, Food Chem. Toxicol. 36 (1998) 279.
- [49] C. Britt, E.A. Gomaa, J.I. Gray, A.M. Booren, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 4891.
- [50] L.B. Fay, S. Ali, G.A. Gross, Mutat. Res. 376 (1997) 29.
- [51] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 775 (1997) 125.
- [52] P. Pais, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 778 (1997) 207.
- [53] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A (2000) in press.
- [54] E. Richling, M. Herderich, P. Schreier, Chromatographia 42 (1996) 7.
- [55] L. Puignou, J. Casal, F.J. Santos, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 769 (1997) 293.
- [56] S.D. Mendonsa, R.J. Hurtubise, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 22 (1999) 1027.
- [57] J.C. Olsson, A. Dyremark, B. Karlberg, J. Chromatogr. A 765 (1997) 329.
- [58] Y.I. Zhao, M. Schelfaut, P. Sandra, F. Banks, Electrophoresis 19 (1998) 2213.
- [59] M. Vanderlaan, B.E. Watkins, M. Hwan, M.G. Knize, J.S. Felton, Carcinogenesis 9 (1988) 153.
- [60] M. Vanderlaan, B.E. Watkins, M. Hwang, M.G. Knize, J.S. Felton, Carcinogenesis 10 (1989) 2215.
- [61] B. Commoner, A.J. Vithayathil, P. Dolara, S. Nair, P. Madyastha, G.C. Cuca, Science 201 (1978).
- [62] J.S. Felton, S. Healy, D. Stuermer, C. Berry, H. Timourian, F.T. Hatch, M. Morris, L.F. Bjeldanes, Mutat. Res. 88 (1981) 33.
- [63] L.F. Bjeldanes, K.R. Grose, P.H. Davis, D.H. Stuermer, S.K. Healy, J.S. Felton, Mutat. Res. 105 (1982) 43.
- [64] H. Herikstad, J. Sci. Food Agric. 35 (1984) 900.
- [65] J.S. Felton, M.G. Knize, C. Wood, B.J. Wuebbles, S.K. Healy, D.H. Stuermer, L.F. Bjeldanes, B.J. Kimble, F.T. Hatch, Carcinogenesis 5 (1984) 95.
- [66] R.T. Taylor, E. Fultz, M.G. Knize, J. Environ. Sci. Health A20 (1985) 135.
- [67] K.R. Grose, J.L. Grant, L.F. Bjeldanes, B.D. Andresen, S.K. Healy, P.R. Lewis, J.S. Felton, F.T. Hatch, J. Agric. Food Chem. 34 (1986) 201.
- [68] J.S. Felton, M.G. Knize, N.H. Shen, P.R. Lewis, B.D. Andresen, J. Happe, F.T. Hatch, Carcinogenesis 7 (1986) 1081.
- [69] G. Becher, M.G. Knize, I.F. Nes, J.S. Felton, Carcinogenesis 9 (1988) 247.
- [70] K. Skog, M.G. Knize, J.S. Felton, M. Jägerstad, Mutat. Res. 268 (1992) 191.
- [71] K. Wakabayashi, I.-S. Kim, R. Kurosaka, Z. Yamaizumi, H. Ushiyama, M. Takahashi, S. Koyota, A. Tada, H. Nukaya, S. Goto, T. Sugimura, M. Nagao, in: R.H. Adamson, J.A. Gustafsson, N. Ito, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Y. Yamazoe (Eds.), Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation, Princeton Scientific, Princeton, NJ, 1995, p. 39.
- [72] A. Abu-Shakra, C. Ioannides, R. Walker, J. Sci. Food Agric. 42 (1988) 343.
- [73] D.S. Davies, J.K. Chipman, M.A. Cooke, J. Food Sci. 58 (1993) 1216.
- [74] H. Hayatsu, T. Hayatsu, Y. Wataya, Environ. Health Perspect. 67 (1986) 31.
- [75] K. Skog, M. Jägerstad, A.L. Reuterswärd, Food Chem. Toxicol. 30 (1992) 681.
- [76] H. Kasai, S. Nishimura, M. Nagao, A. Takahashi, T. Sugimura, Cancer Lett. 7 (1979) 343.
- [77] W.S. Barnes, J.C. Maher, J.H. Weisburger, J. Agric. Food Chem. 31 (1983) 883.
- [78] C.G. Edmons, S.K. Sethi, Z. Yamaizumi, H. Kasai, S. Nishimura, J.A. McCloskey, Environ. Health Perspect. 67 (1986) 35.
- [79] L.M. Tikkanen, T.M. Sauri, K.J. Latua-Kala, Food Chem. Toxicol. 31 (1993) 717.
- [80] C.L. Holder, S.W. Preece, S.C. Conway, Y.M. Pu, D.R. Doerge, Rapid Commun. Mass Spectrom. 11 (1997) 1667.
- [81] R.J. Turesky, C.M. Forster, H.U. Aeschbacher, H.P. Würzner, P.L. Skipper, L.J. Trudel, S.R. Tannenbaum, Carcinogenesis 10 (1989) 151.
- [82] M.G. Knize, C.P. Salmon, E.C. Hopmans, J.S. Felton, J. Chromatogr. A 763 (1997) 179.
- [83] R.J. Turesky, H. Bur, T. Huynh-Ba, H.U. Aeschbacher, H. Milon, Food Chem. Toxicol. 26 (1988) 501.
- [84] S. Murray, A.M. Lynch, M.G. Knize, N.J. Gooderham, J. Chromatogr. 616 (1993) 211.
- [85] B. Stavric, B.P.Y. Lau, T.I. Matula, R. Klassen, D. Lewis, R.H. Downie, Food Chem. Toxicol. 35 (1997) 185.
- [86] M. Murkovic, H.J. Weber, S. Geiszler, K. Frohlich, W. Pfannhauser, Food Chem. 65 (1999) 233.
- [87] M. Takahashi, K. Wakabayashi, M. Nagao, M. Yamamoto, T. Masui, T. Goto, N. Kinai, I. Tomita, T. Sugimura, Carcinogenesis 6 (1985) 1195.
- [88] M. Takahashi, K. Wakabayashi, M. Nagao, Z. Yamaizumi, H. Sato, N. Kinai, I. Tomita, T. Sugimura, Carcinogenesis 6 (1985) 1537.
- [89] G. Gross, G. Philipposian, H.U. Aeschbacher, Carcinogenesis 10 (1989) 1175.
- [90] G. Gross, Carcinogenesis 11 (1990) 1597.
- [91] B. Stavric, B.P.Y. Lau, T.I. Matula, R. Klassen, D. Lewis, R.H. Downie, Food Chem. Toxicol. 35 (1997) 199.
- [92] K. Skog, G. Steineck, K. Augustsson, M. Jägerstad, Carcinogenesis 16 (1995) 861.
- [93] H. Hayatsu, T. Oka, A. Wakata, Y. Ohara, T. Hayatsu, H. Kobayashi, S. Arimoto, Mutat. Res. 119 (1983) 233.
- [94] M.T. Galceran, P. Pais, L. Puignou, J. Chromatogr. A 655 (1993) 101.

- [95] M. Johansson, K. Skog, M. Jägerstad, *Carcinogenesis* 14 (1993) 89.
- [96] M.M.C. Van Dyck, B. Rollmann, C. De Meester, *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 377.
- [97] L.S. Jackson, W.A. Hargraves, W.H. Stroup, G.W. Diachenko, *Mutat. Res.* 320 (1994) 113.
- [98] E. Richling, D. Haring, M. Herderich, P. Schreier, *Chromatographia* 48 (1998) 258.
- [99] C. Mardones, L. Arce, A. Rios, M. Valcarcel, *Chromatographia* 48 (1998) 700.
- [100] R. Schwarzenbach, D. Gubler, *J. Chromatogr.* 624 (1992) 491.
- [101] L. Rivera, M.J.C. Curto, P. Pais, M.T. Galceran, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 85.
- [102] M. Murkovic, D. Steinberger, W. Pfannhauser, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 477.
- [103] G. Gross, A. Grüter, *J. Chromatogr.* 592 (1992) 271.
- [104] M.G. Knize, P.L. Cunningham, J.R. Avila, A.L. Jones, E.A. Griffin, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 55.
- [105] M.G. Knize, F.A. Dolbeare, K.L. Carroll, D.H. Moore, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 595.
- [106] J.S. Felton, E. Fultz, F.A. Dolbeare, M.G. Knize, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 897.
- [107] M.T. Galceran, E. Moyano, L. Puignou, P. Pais, *J. Chromatogr. A* 730 (1996) 185.
- [108] G.A. Gross, A. Grüter, S. Heyland, *Food Chem. Toxicol.* 30 (1992) 491.
- [109] M.G. Knize, P.L. Cunningham, E.A. Griffin, A.L. Jones, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 32 (1994) 15.
- [110] U. Brockstedt, W. Pfau, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 207 (1998) 472.
- [111] K. Skog, K. Augustsson, G. Steineck, M. Stenberg, M. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 555.
- [112] B.H. Chen, D.J. Yang, *Chromatographia* 48 (1998) 223.
- [113] G.A. Gross, in: R.H. Adamson, J.A. Gustafsson, N. Ito, M. Nagao, T. Sugimura, K. Wakabayashi, Y. Yamazoe (Eds.), *Proceedings of the 23rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Foundation*, Princeton Scientific, Princeton, NJ, 1995, p. 20.
- [114] G.A. Gross, R.J. Turesky, L.B. Fay, W.G. Stillwell, P.L. Skipper, S.R. Tannenbaum, *Carcinogenesis* 14 (1993) 2313.
- [115] H.P. Thiebaut, M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, J.S. Felton, D.P. Hsieh, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1502.
- [116] H.P. Thiebaut, M.G. Knize, P.A. Kuzmicky, D.P. Hsieh, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 821.
- [117] M.A.E. Johansson, L. Fredholm, I. Bjerne, M. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 993.
- [118] M.G. Knize, R. Sinha, N. Rothman, E.D. Brown, C.P. Salmon, O.A. Levander, P.L. Cunningham, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 33 (1995) 545.
- [119] R. Sinha, N. Rothman, E.D. Brown, C.P. Salmon, M.G. Knize, C.A. Swanson, S.C. Rossi, S.D. Mark, O.A. Levander, J.S. Felton, *Cancer Res.* 55 (1995) 4516.
- [120] M.G. Knize, C.P. Salmon, S.S. Mehta, J.S. Felton, *Mutat. Res.* 376 (1997) 129.
- [121] C.P. Salmon, M.G. Knize, J.S. Felton, *Food Chem. Toxicol.* 35 (1997) 433.
- [122] R. Sinha, M.G. Knize, C.P. Salmon, E.D. Brown, D. Rhodes, J.S. Felton, O.A. Levander, N. Rothman, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 289.
- [123] F. Toribio, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 836 (1999) 223.