

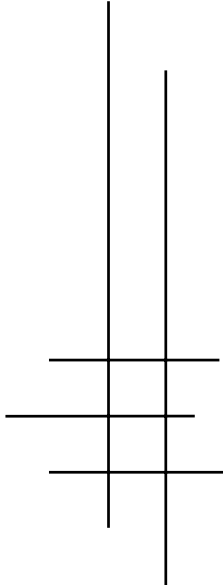


U

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
Departament de Química Analítica

B

Programa de doctorado  
QUÍMICA ANALÍTICA DEL MEDI AMBIENT I LA POL·LUCIÓ  
(Bienio 1997-1999)



**DESARROLLO DE METODOLOGÍA  
ANALÍTICA BASADA EN EL USO DE  
TÉCNICAS COMBINADAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE AMINAS  
HETEROCÍCLICAS EN ALIMENTOS**

---

Memoria presentada por la Sra. Francisca Toribio Santisteban  
para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas  
por la Universitat de Barcelona

Directores:

Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet y Dr. Lluís Puignou i Garcia

Barcelona, julio de 2003

La ciencia apenas sirve para nada más  
que para darnos cuenta de la extensión de  
nuestra ignorancia.

Félix Lamennais (1782-1854)

Escritor y pensador.

Nada que pueda conseguirse sin pena  
y sin trabajo es verdaderamente valioso.

Joseph Addison (1672-1719)

Poeta.

Dedicado con cariño a Javi  
y a mis padres



**AGRADECIMIENTOS**

---

No es fácil expresar en unas cuantas líneas de texto lo mucho que quiero agradecer a tantas personas que me han rodeado durante estos últimos años.

En primer lugar, quisiera hacer constar mi agradecimiento a las personas que han guiado el trabajo realizado en mi Tesis Doctoral, la Doctora Maria Teresa Galceran y el Doctor Lluís Puignou. Ellos han sabido orientar mi trabajo con sabios consejos, dedicándome parte de su precioso tiempo. Gracias también a la Dra. Encarnación Moyano, a la que debo gran parte del conocimiento que he adquirido en el campo de la espectrometría de masas, y al Dr. Francisco Javier Santos, el cual me ha proporcionado una valiosa ayuda en múltiples ocasiones.

Han sido muchas las personas que he conocido en el Departamento, y todos ellos han aportado su granito de arena para hacer este tiempo inolvidable. Gracias a toda la gente del grupo CECM, porque han conseguido hacer más agradable el trabajar. Mi agradecimiento a los que están actualmente en el laboratorio (las veteranas Nieves y Vicky; Óscar el “quatero”; Ramsés, el chico de la FFF; Pablo, Jessi y Jordi, los de gases; Elena, Eli, Rosa y Sònia, las chicas del grupo aminero; Maite y Ester, las últimas adquisiciones del grupo) y a los que ya se marcharon (Olga, Leti, Rocío, Juana, Leonís, Javi “Cubano”, David, Magda, Alberto, Nuri...). Gracias también a otras personas que no han trabajado directamente conmigo pero que también han demostrado muchas veces su apoyo: Boris, Rosa, Toni, Nuria, Xavi, Alberto, Encarna, Raimundo...

Es mucho también lo que debo agradecer al Doctor Norberto Guzman, la persona que amplió mi visión del mundo con su extensa experiencia y sus vastos conocimientos. Gracias a él tuve la oportunidad de conocer un mundo muy diferente al que estaba acostumbrada.

A todos mis amigos, muchísimas gracias por vuestra valiosa amistad, la cual me habéis demostrado en innumerables ocasiones. Con vosotros he pasado sin duda algunos de los mejores momentos de mi vida.

Por supuesto, quiero darle las gracias a mi familia por su inestimable apoyo, cariño y comprensión. A mis padres les debo innumerables cosas, y es por ello que quisiera dedicarles esta memoria.

Finalmente, quiero darte las gracias, Javi, por tu incondicional y constante amor. A ti también va dedicada esta memoria.



ÍNDICE

---

---

	<u>Página</u>
<b>PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA</b>	<b>1</b>
<b>1. Objetivos</b>	<b>3</b>
<b>2. Estructura</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Las Aminas Heterocíclicas</b>	<b>9</b>
1.1.1. La dieta y el cáncer	9
1.1.2. Descubrimiento de las HAs	11
1.1.3. Toxicidad de las HAs	12
1.1.4. Formación de las HAs	17
<b>1.2. Análisis de las Aminas Heterocíclicas</b>	<b>33</b>
1.2.1. Métodos de tratamiento de muestra	33
1.2.1.1. Matrices alimentarias y sistemas modelo	34
- Artículo I: <i>Separation of heteroaromatic amines in food products</i>	35
- Información adicional	69
1.2.1.2. Muestras medioambientales	75
1.2.1.3. Muestras biológicas	77
1.2.2. Métodos de determinación	81
1.2.2.1. Cromatografía de líquidos	82
1.2.2.2. Cromatografía de líquidos-Espectrometría de masas	86
1.2.2.3. Cromatografía de gases	90
1.2.2.4. Electroforesis capilar	92
<b>2. ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA</b>	<b>95</b>
<b>2.1. Introducción general</b>	<b>97</b>
<b>2.2. Extracción en fase sólida</b>	<b>98</b>
2.2.1. Introducción y objetivos	98
2.2.2. Trabajo experimental	105
2.2.2.1. Estudio preliminar	105
2.2.2.2. Artículo II: <i>Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic amines in a lyophilized meat extract</i>	113

	<u>Página</u>
2.2.2.3. Artículo III: <i>Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract</i>	127
<b>2.3. Extracción con fluidos supercríticos</b>	<b>141</b>
2.3.1. Introducción y objetivos	141
2.3.2. Trabajo experimental	146
<b>2.4. Discusión de resultados</b>	<b>153</b>
<b>2.5. Conclusiones</b>	<b>161</b>
<b>3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b>	<b>165</b>
<b>3.1. Introducción general</b>	<b>167</b>
<b>3.2. Espectrometría de masas con un analizador de trampa de iones</b>	<b>170</b>
3.2.1. Introducción y objetivos	170
3.2.2. Trabajo experimental	173
3.2.2.1. Comparación de los sistemas reguladores fosfórico/fosfato y fórmico/formiato	173
3.2.2.2. Artículo IV: <i>Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry</i>	183
3.2.2.3. Artículo V: <i>Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser</i>	197
3.2.2.4. Artículo VI: <i>Ion trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food</i>	217
<b>3.3. Espectrometría de masas con un analizador de triple cuadrupolo</b>	<b>235</b>
3.3.1. Introducción y objetivos	235
3.3.2. Trabajo experimental	239
- Artículo VII: <i>Analysis of heterocyclic amines by liquid chromatography-mass spectrometry: ion trap vs. triple quadrupole</i>	239
<b>3.4. Discusión de resultados</b>	<b>261</b>
3.4.1. Límites de detección de los métodos LC-MS	261
3.4.2. Comparación de los métodos LC-UV y LC-MS	267
3.4.3. Estudios de fragmentación de las HAS	269
<b>3.5. Conclusiones</b>	<b>277</b>

---

	<u>Página</u>
<b>4. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA Y APLICACIÓN A ALIMENTOS CÁRNICOS</b>	<b>283</b>
<b>4.1. Introducción general</b>	<b>285</b>
<b>4.2. Ejercicios de intercomparación</b>	<b>287</b>
4.2.1. Introducción y objetivos	287
4.2.2. Trabajo experimental	287
4.2.2.1. Análisis de una disolución de referencia	287
4.2.2.2. Análisis del Lote A	293
4.2.2.3. Análisis del Lote B	296
4.2.2.4. Análisis del Lote C	301
<b>4.3. Análisis de muestras de ternera a la plancha</b>	<b>305</b>
4.3.1. Introducción y objetivos	305
4.3.2. Trabajo experimental	307
- Artículo VIII: <i>Heterocyclic amines in griddled beef steak using a single extract clean-up procedure</i>	307
<b>4.4. Discusión de resultados</b>	<b>321</b>
4.4.1. Precisión de los métodos LC-UV y LC-MS	321
4.4.2. Exactitud de los métodos LC-UV y LC-MS	322
4.4.3. Adición estándar vs. dilución isotópica	324
4.4.4. Validación de la metodología de tratamiento de muestra	326
4.4.5. Análisis de HAs en muestras de ternera a la plancha	328
<b>4.5. Conclusiones</b>	<b>331</b>
<b>CONCLUSIONES DE LA MEMORIA</b>	<b>333</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>337</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>355</b>





# PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA

---

1. OBJETIVOS

2. ESTRUCTURA

## 1. OBJETIVOS

Las aminas heterocíclicas (HAs) son compuestos con una elevada actividad mutagénica que se generan durante el procesado térmico de alimentos proteicos. Dada la posible carcinogenicidad de las HAs en humanos, es necesario conocer con un elevado grado de fiabilidad el contenido de estos microcontaminantes en alimentos. Sin embargo, debido por un lado al bajo nivel de concentración al que se forman estos analitos y por otro lado a la elevada complejidad de la matriz en la que se encuentran, no es fácil el disponer de métodos de análisis adecuados para su determinación.

El objetivo global de la presente memoria ha sido por tanto el establecimiento de metodología analítica lo suficientemente selectiva y sensible como para permitir la cuantificación fiable de HAs en alimentos proteicos procesados térmicamente.

Este objetivo general se ha concretado en los siguientes puntos:

- Evaluar diferentes métodos de tratamiento de muestra basados en la extracción en fase sólida con el fin de proponer un método alternativo que sea más sencillo que los utilizados normalmente y que permita el análisis de un elevado número de analitos.
- Acoplar la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas con el fin de desarrollar métodos de análisis selectivos y sensibles que permitan la determinación e identificación de las HAs en alimentos procesados térmicamente a los bajos niveles de concentración en que se encuentran.
- Establecer los modelos de fragmentación de las HAs mediante espectrometría de masas en tándem múltiple para posibilitar la identificación de nuevos compuestos pertenecientes a esta familia.
- Validar la metodología establecida mediante la participación en ejercicios interlaboratorio.
- Determinar el contenido de HAs en muestras de alimentos. En concreto, se ha seleccionado la ternera a la plancha por ser uno de los platos más consumidos en nuestro país, como se desprende de una encuesta realizada por nuestro grupo de trabajo.

## 2. ESTRUCTURA

La memoria que se presenta se ha estructurado en cuatro capítulos. En el primero de ellos (Capítulo 1), se presenta una introducción general sobre los compuestos estudiados, las Aminas Heterocíclicas. Asimismo, se incluye un artículo en el que se recopila la bibliografía relacionada con el análisis de HAs en alimentos.

A continuación, en los Capítulos 2-4 se expone el trabajo experimental realizado a lo largo de la Tesis Doctoral. Así, en el Capítulo 2 se engloban las actividades relacionadas con el estudio del tratamiento de muestra. Entre ellas, se describe la comparación y optimización de diferentes métodos de extracción y purificación.

En el Capítulo 3 se describe el desarrollo de la metodología basada en el acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas. Además de establecer los parámetros de calidad tanto en MS como en MS/MS, se han estudiado la rutas de fragmentación de las HAs, utilizando primero un instrumento con analizador de trampa de iones y más tarde uno de triple cuadrupolo. Por otro lado, se describen diferentes aplicaciones que permiten evaluar los dos instrumentos utilizados.

En el Capítulo 4 se incluye en primer lugar la validación de la metodología desarrollada en los capítulos anteriores mediante la participación en ejercicios interlaboratorio, organizados en el marco del Proyecto Europeo “Heterocyclic Amines in Cooked Foods-Role in Human Health” (QLK1-CT99-01197, 1999). Seguidamente, se recogen los resultados obtenidos en el análisis de varias muestras de ternera frita de diferente origen.

Al final de la memoria se incluyen las conclusiones globales del trabajo realizado.

En cuanto a la estructura interna de los capítulos en los que se recoge el trabajo experimental, estos se inician con una introducción al tema desarrollado seguida de una exposición de los objetivos concretos de cada capítulo. A continuación se presenta el trabajo experimental realizado, bien en forma de publicaciones o bien como trabajo experimental adicional no publicado. Seguidamente se incluye una discusión general del trabajo expuesto, y al final las correspondientes conclusiones.

La distribución de las publicaciones a lo largo de los capítulos es la indicada a continuación:

### **Capítulo 1**

- 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.

### **Capítulo 2**

- Artículo II: *Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic amines in a lyophilized meat extract.*  
F. Toribio, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Journal of Chromatography A*, 836 (1999) 223-233.
- Artículo III: *Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract.*  
F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Journal of Chromatography A*, 880 (2000) 101-112.

### **Capítulo 3**

- Artículo IV: *Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.*  
F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Journal of Chromatography A*, 869 (2000) 307-317.
- Artículo V: *Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser.*  
F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Journal of Mass Spectrometry*, 37 (2002) 812-828.
- Artículo VI: *Ion trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food.*  
F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Journal of Chromatography A*, 948 (2002) 267-281.

- Artículo VII: *Analysis of heterocyclic amines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: ion trap vs. triple quadrupole.*  
F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, enviado.

#### **Capítulo 4**

- Artículo VIII: *Heterocyclic amines in griddled beef steak using a single extract clean-up procedure.*  
F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.  
*Food and Chemical Toxicology*, enviado.