

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Wpływ marynowania na powstawanie heterocyklicznych amin aromatycznych w mięsie poddawany grillowaniu

AGNIESZKA FRALA<sup>1</sup>, RYSZARD KOWALSKI<sup>2</sup>, AGNIESZKA WAŚKIEWICZ<sup>3</sup>, TOMASZ SZABLEWSKI<sup>4</sup>  
UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, <sup>1</sup>KATEDRA BIOCHEMII I ANALIZY ŻYwności,  
<sup>2</sup>Instytut Technologii Mięsa, <sup>3</sup>KATEDRA CHEMII, <sup>4</sup>KATEDRA Zarządzania Jakością ŻYwności

**Słowa kluczowe:** mięso, grillowanie, heterocykliczne aminy aromatyczne

#### STRESZCZENIE

Przeprowadzone badania wykazały, że znaczącą rolę w procesie syntezy heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA) odgrywają dodatki stosowane w procesie produkcji przetworów mięsnych. Wysoka temperatura podczas grillowania sprzyja powstawaniu wymienionych związków, dlatego też podjęto próbę odpowiedniego doboru marynat, których skład mógłby wpłynąć na obniżenie poziomu stężenia kancerogennych HCA. Do badań wykorzystano schab wieprzowy marynowany w trzech rodzajach solanek. Próbę kontrolną stanowiło mięso niemarynowane. Wyodrębnienie i oczyszczenie frakcji HCA przeprowadzono wykorzystując ekstrakcję do fazy stałej (SPE). Analizę ilościową wykonano metodą HPLC - PAD. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono obecność heterocyklicznych amin aromatycznych, których poziomy stężeń były zróżnicowane i zależały od rodzaju zastosowanej solanki.

### Effects of marination on the formation of heterocyclic aromatic amines in grilled meat

**Keywords:** meat, grilling, heterocyclic aromatic amines

#### ABSTRACT

Research has shown that the non-meat additives applied in meat products during the process of production and thermal treatment conditions play a major role in HCA's synthesis. Grilling in high temperature is conducive to HCA's formation and as a result, the actions have been undertaken in order to get a proper selection of marinades which reduce synthesis of mutagenic and carcinogenic HCAs. The study was carried out pork loin. Marinated muscles and a sample test were put to thermal treatment and then they were analysed. Isolation and purification of HCA's fractions were carried out using solid-phase extraction (SPE). The samples were analysed by HPLC-PAD. Four different heterocyclic aromatic amines (IQ, MeIQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP) were found in meat extract. Concentration levels were varied and depended on the type of brine.

## 1. WSTĘP

Liczne badania wykazały, że obróbka termiczna mięsa sprzyja powstawaniu wielu związków, które nie występują w mięsie surowym. Udowodniono także, że część z tych substancji ma działanie kancerogenne na organizm człowieka. Do grupy tych związków zaliczane są heterocykliczne aminy aromatyczne (HCA), które formują się podczas wysokotemperaturowej obróbki termicznej we wszystkich rodzajach mięs. Związki te w swoich cząsteczkach mogą zawierać struktury imidazopirydyny, imidazochinoliny, imidazochinoksaliny czy też pirydoindolu [1, 2].

Spośród ponad 20 zidentyfikowanych heterocyklicznych amin aromatycznych Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC, z ang. *International Agency for Research on Cancer*) [3] zaliczyła dziewięć do grupy substancji mogących bezpośrednio powodować powstawanie nowotworów u człowieka. Do ludzkich kancerogenów klasy 2A zostały zaliczone między innymi 2-amino-3,4-dimetyloimidazo [4,5-f] chinolina (MeIQ), 2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo [4,5-f] chinoksalina (4,8-DiMeIQx) oraz 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo [4,5-b] pirydyna (PhIP). Ta ostatnia uznana została za tworzącą się najczęściej [4, 5]. Ponadto do ludzkich kancerogenów klasy 2B IARC [3] zaliczyła 2-amino-3-metyloimidazo [4,5-f] chinolinę (IQ). Prekursorami powstawania wszystkich czterech heterocyklicznych amin są kreatyna oraz glukoza. W zależności od rodzaju HCA, ich powstawanie jest przyspieszane również przez zawartość różnych wolnych aminokwasów i innych, obok wspomnianej glukozy, cukrów prostych. Szczególną rolę w tworzeniu PhIP oraz IQ odgrywa fenyloalanina [6], w przypadku tej drugiej aminy są to ponadto glicyna, seryna, prolina oraz fruktoza [7]. Prekursorem powstawania MeIQ jest alanina [8], natomiast 4,8-DiMeIQx tworzy się ponadto przez obecność treoniny, lizyny, fruktozy i rybozy [8, 9].

Wg Perssona i in. [10] dodanie węglowodanów do mięsa przed jego obróbką termiczną może okazać się prostym sposobem redukcji powstawania omawianych kancerogenów. Rola monosacharydów w reakcji powstawania HCA jest jednak złożona i nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Z jednej strony udowodniono, iż przy określonym stężeniu są one prekursorami aminoazaarenow, z drugiej zaś wykazano, że wzrost stężenia np. glukozy w mieszaninie reakcyjnej obniża wydajność syntezy amin [2, 11].

Prowadzone są liczne badania zmierzające do określenia czynników wpływających na powstawanie heterocyklicznych amin aromatycznych (HCA) oraz warunków i możliwości obniżenia ich zawartości w żywności.

Celem pracy była ocena wpływu zróżnicowanych pod względem składu marynat, na intensywność formowania się wybranych heterocyklicznych amin aromatycznych w mięsie poddawanych grillowaniu.

## 2. MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano mięso wieprzowe (schab), które marynowano w solankach zawierających odpowiednio: 6% NaCl (solanka I), 4% dekstrozy i 6% NaCl (solanka II) oraz 3% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i 6% NaCl (solanka III) przez 24 godziny. Marynowane mięso poddano procesowi obróbki termicznej, którą prowadzono przy użyciu grilla elektrycznego z gładką powierzchnią grzewczą, w temperaturze 250°C przez 10 minut. Próbę kontrolną stanowiło mięso przygotowywane w ten sam sposób, przechowywane przez 24 godziny, z pominięciem procesu marynowania. Gotowe próby zamrożono i odwodniono.

Wyodrębnienie i oczyszczenie frakcji heterocyklicznych amin aromatycznych przeprowadzono przy wykorzystaniu ekstrakcji do fazy stałej (SPE), opierając się na metodyce opracowanej przez Grossa i Grütera [12] oraz Messnera i Murkovića [13]. Do analizy ilościowej zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Analizę chemiczną czterech amin (2-amino-3,4-dimetyloimidazo [4,5-f] chinoliny, 2-amino-3-metyloimidazo [4,5-f] chinoliny, 2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo [4,5-f] chinoksaliny oraz 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo [4,5-b] pirydyny) przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu aparatury Waters 2695, Photodiode Array Detektor Waters 2996 oraz kolumny Nova Pak C18 3,9 ´ 300 mm, przy długości fali 262 nm. Skład solwentu oraz jego gradientowy przepływ były zgodne z metodą opracowaną przez Chevolleau i in. [14]. Statystyczną analizę danych przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 10.0. W pierwszym etapie analizy statystycznej wyznaczono średnie, odchylenia standardowe, przedziały ufności oraz błędy statystyczne. Kolejnym etapem analizy statystycznej była analiza wariancji ANOVA z zastosowaniem testu C Cochrańa, Hartleya, Barletta. Następnie dla danych parametrycznych przeprowadzono test post-hoc Tukeya (HSD).

### 3. WYNIKI I ICH DYSKUSJA

W ekstraktach z mięsa wieprzowego oznaczono zawartość 2-amino-3,4-dimetyloimidazo [4,5-f] chinoliny (MeIQ), 2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo [4,5-f] chinoksaliny (4,8-DiMeIQx), 2-amino-3-metyloimidazo [4,5-f] chinoliny (IQ) oraz 2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo[4,5-b]pirydyny (PhIP). Wyniki poddano analizie statystycznej. W Tabeli 1 przedstawiono zawartość poszczególnych heterocyklicznych amin aromatycznych w  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  mięsa grillowanego liofilizowanego.

Bez względu na rodzaj użytej solanki nie wykazano różnic pomiędzy zawartością IQ i MeIQ, statystycznie istotne różnice stwierdzono natomiast pomiędzy zawartością tych amin i 4,8-DiMeIQx oraz PhIP w poszczególnych próbach.

Stwierdzono, że wpływ solanek był zróżnicowany i na każdą aminę oddziaływał w innym stopniu. Solanka II spowodowała ponad dwukrotny wzrost zawartości IQ (z 0,056 do około 0,17  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$ ) w porównaniu z próbą kontrolną, solanka I obniżyła zawartość IQ zaledwie o 10%, natomiast zastosowanie solanki III spowodowało 40% spadek zawartości tego związku. Zaobserwowane różnice pomiędzy zawartością IQ w każdej próbie nie zostały jednak uznane za statystycznie istotne.

W próbie wieprzowiny traktowanej solanką II wzrosła ilość IQ, natomiast stężenie pozostałych amin (MeIQ, 4,8-DiMeIQx oraz PhIP) spadło o odpowiednio 73, 38 i 12,5% w porównaniu z próbą kontrolną. Solanki I i III spowodowały obniżenie

stężenia wszystkich omawianych kancerogenów. Dla porównania wyników niniejszego doświadczenia warto przywołać badania Busquetsa i in. [15] oraz Skoga i in. [16, 17], którzy oznaczyli zawartość IQ w wieprzowinie na poziomie 0,10  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$ , natomiast zawartość o ponad połowę niższą (0,04  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$ ) uzyskali Vahl i in. [18]. Przedmiotowa literatura podaje również, że w wieprzowinie poddanej obróbce termicznej (w tym również grillowaniu) nie wykryto IQ lub oznaczono stężenie zbyt niskie, aby można było określić IQ ilościowo [16, 19-22]. Niektórzy autorzy donoszą o większych stężeniach IQ, i tak w grillowanej przez 30 min polędwicy oznaczono 6,7  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$ , natomiast w karkówce 5,8  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [22]. Dla porównania zawartość IQ w wołowinie oznaczono na poziomie 94  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [13]. W literaturze przedmiotu zawartość MeIQ w mięsie wieprzowym poddanym obróbce termicznej oznaczano na różnych poziomach, od 0,14  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [23], poprzez 1,72  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [24], do 12,6  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [22]. Podobną zależność można zauważyć dla wyników badań dotyczących kolejnego kancerogenu, 4,8-DiMeIQx oznaczanego na poziomach 1,1  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [16], 4,2  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [17] oraz 29,5  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [22]. W wołowinie zawartość MeIQ oznaczono na poziomie 3,5  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [25], natomiast maksymalne stężenie 4,8-DiMeIQx wynosiło 95  $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$  [13].

Stężenie 2-amino-1-metylo-6-fenyloimidazo [4,5-b] pirydyny (PhIP) było niekiedy stukrotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi trzema aminami. Wyniki niniejszego doświadczenia można przy-

**Tabela 1** Zawartość heterocyklicznych amin aromatycznych w schabie  
**Table 1** Heterocyclic aromatic amines amount in pork loin

Rodzaj próby	Heterocykliczne aminy aromatyczne ( $\text{ng}\times\text{g}^{-1}$ mięsa liofilizowanego)			
	IQ	MeIQ	4,8-DiMeIQx	PhIP
Próba kontrolna	0,056 ± 0,004 <sup>aA</sup>	0,534 ± 0,023 <sup>aB</sup>	48,104 ± 0,764 <sup>cB</sup>	43,149 ± 0,845 <sup>bB</sup>
Solanka I (6% NaCl)	0,050 ± 0,003 <sup>aA</sup>	0,209 ± 0,011 <sup>aA</sup>	34,125 ± 0,421 <sup>bA</sup>	38,253 ± 0,634 <sup>cB</sup>
Solanka II (4% dekstroza, 6% NaCl)	0,169 ± 0,020 <sup>aA</sup>	0,145 ± 0,010 <sup>aA</sup>	29,985 ± 0,322 <sup>bA</sup>	37,761 ± 0,657 <sup>cA</sup>
Solanka III (3% P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 6% NaCl)	0,034 ± 0,002 <sup>aA</sup>	0,106 ± 0,010 <sup>aA</sup>	32,827 ± 0,463 <sup>bA</sup>	36,765 ± 0,342 <sup>cA</sup>

<sup>a b c</sup> różnice istotne statystycznie, na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  (porównanie w rzędach)

<sup>A B C</sup> różnice istotne statystycznie, na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  (porównanie w kolumnach)

równać do oznaczeń przeprowadzonych przez Sinha i in. [26] oraz przez Skoga i in. [17], którzy w badanej wieprzowinie oznaczyli zawartość PhIP na poziomie odpowiednio 30,3 i 32,0 ng×g<sup>-1</sup>. Ponadto w schabie ogrzewanym w temperaturze 220°C oznaczono od 130 do 320 ng×g<sup>-1</sup> PhIP [13], natomiast w schabie grillowanym 285,2 ng×g<sup>-1</sup> [19].

Zazwyczaj PhIP oznaczana jest w ilości około 35 ng×g<sup>-1</sup>, jednak istnieją doniesienia o wyższych poziomach tego kancerogenu, zwłaszcza w mięsie drobiowym. PhIP tworzy się łatwiej w wysokich temperaturach, używanych m.in. podczas grillowania [30]. Amina ta została oznaczona na poziomie 480 ng×g<sup>-1</sup> w piersi kurczaka grillowanej w 177-260°C [27], 330 ng×g<sup>-1</sup> w tuszce kurczaka grillowanej w całości w 339-365°C [28] oraz 270 ng×g<sup>-1</sup> w kurczaku dobrze wysmażonym [29].

Na różnice pomiędzy danymi literaturowymi a wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy mogło wpłynąć wiele czynników, m.in. czas i temperatura procesu obróbki termicznej. Udowodniono, że w zależności od zmiany warunków i parametrów czasu oraz temperatury zawartość HCA może się zmieniać nawet 100-krotnie [31].

#### 4. WNIOSKI

- 1) We wszystkich ekstraktach pozyskanych z mięsa poddanego grillowaniu stwierdzono obecność 2-amino-3,4-dimetyloimidazo [4,5-f] chinoliny (MeIQ), 2-amino-3,4,8-trimetyloimidazo [4,5-f] chinoksaliny (4,8-DiMeIQx), 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo [4,5-b] pirydyny (PhIP) oraz 2-amino-3-metyloimidazo [4,5-f] chinoliny (IQ).
- 2) W najwyższych stężeniach oznaczono PhIP i 4,8-DiMeIQx.
- 3) Dodatek solanek marynujących o zawartości 6% NaCl oraz 6% NaCl i 4% dekstrozy spowodował ograniczenie powstawania PhIP. Zawartość PhIP spadła o około 12% w porównaniu z próbą kontrolną. Jeszcze bardziej skuteczny okazał się dodatek solanki III, który obniżył zawartość PhIP o 15%.
- 4) Dodatek solanek I i III wpłynął inhibująco na powstawanie IQ, natomiast solanka II zwiększyła stężenie tego kancerogenu.
- 5) Zastosowane solanki inhibowały powstawanie 4,8-DiMeIQx oraz MeIQ.
- 6) Wyniki badań sugerują efektywniejsze działanie solanki III, ponieważ skuteczniej inhibowała tworzenie się PhIP, która, jak wspomniano, jest aminą tworzącą się w największych ilościach podczas grillowania.

#### LITERATURA

- [1] Andrés F. de, Zougagh M., Castañeda G., Ríos A., Determination of heterocyclic amines in urine samples by capillary liquid chromatography with evaporated lightscattering detection, Anal. Bioanal. Chem. 397, 2010, 223-231.
- [2] Skog K., Cooking procedures and food mutagens, a literature review. Food Chem. Toxicol. 31, 1993, 655-675.
- [3] International Agency for Research on Cancer MeIQ, MeIQx, PhIP, IQ: In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France 1993, 56, 195-243.
- [4] Sugimura T., Wakabayashi K., Nakagama H., Nagao M., Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. Cancer Sci. 95, 2004, 290-299.
- [5] Zimmerli B., Rhyn P., Zoller O., Schlatter J., Occurrence of heterocyclic aromatic amines in the Swiss diet: analytical method, exposure estimation and risk assessment. Food Addit. Contam. 18, 2001, 533-551.

- [6] Skog K., Jägerstad M., Effects of glucose on the formation of PhIP in a model system. *Carcinogenesis* 12, 1991, 2297-2300.
- [7] Yoshida D., Sato Y., Mizusaki S., Isolation of 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline as mutagen from the heated product of a mixture of creatine and proline. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1984, 241.
- [8] Grivas S., Nyhammar T., Olsson K., Jägerstad M., Formation of a new mutagenic DiMeIQx compound in a model system by heating creatinine, alanine and fructose. *Mutat. Res.* 1985, 151-177.
- [9] Skog K., Knize M. G., Felton J. S., Jägerstad M., Formation of new heterocyclic amine mutagens by heating creatinine, alanine, threonine and glucose. *Mutat Res.* 268, 1992, 191-197.
- [10] Persson E., Sjöholm I., Nyman M., Skog K., Addition of Various Carbohydrates to Beef Burgers Affects the Formation of Heterocyclic Amines during Frying. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2004, 7561-7566.
- [11] Murkovic M., Formation of heterocyclic aromatic amines in model system. *J. Chromatogr. B* 802, 2004, 3-10.
- [12] Gross G. A., Grüter A., Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J. Chromatogr.* 592, 1992, 271-278.
- [13] Messner C., Murkovic M., Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. B* 802, 2004, 19-26.
- [14] Chevolleau S., Touzet C., Jamin E., Tulliez J., Debrauwer L., Dosage per LC-APCI-MS/MS des amines aromatiques hétérocycliques formées lors de la cuisson des viandes [LC-APCI-MS/MS determination of heterocyclic aromatic amines formed during meat cooking]. *Sci. Aliments.* 27, 2007, 381-395.
- [15] Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M. T., Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *J. Chromatogr. B* 802, 2004, 79-86.
- [16] Skog K., Steineck G., Augustsson K., Jägerstad M., Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. *Carcinogenesis* 16, 1995, 861-867.
- [17] Skog K., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jägerstad M., Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food Chem. Toxicol.* 35, 1997, 555-565.
- [18] Vahl M., Gry J., Nielsen P. A., Mutagens in fried pork add the influence of frying temperature. *Mutat. Res.* 203, 1988, 239.
- [19] Back Y. M., Lee J. H., Shin H. S., Lee K. G., Analysis of heterocyclic amines and beta-carbolines by liquid chromatography-mass spectrometry in cooked meats commonly consumed in Korea. *Food Addit. Contam. Part A Chem.* 26, 2009, 298-305.
- [20] Janoszka B., Błaszczuk U., Damasiewicz-Bodzek A., Sajewicz M., Analysis of heterocyclic amines (HAs) in pan-fried pork meat and its gravy by liquid chromatography with diode array detection. *Food Chem.* 113, 2009, 1188-1196.
- [21] Jo C. H., Sim Y. E., Lee H. M., Ryeom T., Myung S. W., Heterocyclic amines in several types of cooked meat and chicken dishes which form part of the Korean diet. *Food Sci. Technol. Res.* 14, 2008, 169-175.
- [22] Warzecha L., Janoszka B., Błaszczuk U., Stróżyk M., Bodzek D., Dobosz C., Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes. *J. Chromatogr. B* 802, 2004, 95-106.
- [23] Kobayashi M., Hanaoka T., Nishioka S., Kataoka H., Tsugane S., Estimation of dietary HCA intakes in a large-scale population-based prospective study in Japan. *Mutat. Res.* 506-507, 2002, 233-241.
- [24] Janoszka B., Błaszczuk U., Warzecha L., Stróżyk M., Damasiewicz-Bodzek A., Clean-up procedures for analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazaarenes head treated meat samples). *J. Chromatogr. A* 938, 2001, 155-165.
- [25] Balgoh Z., Gray J. I., Gomaa E. A., Booren A. M., Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem. Toxicol.* 38, 2000, 395-401.
- [26] Sinha R., Knize M. G., Salmon C. P., Brown E. D., Rhodes D., Felton J. S., Levander O. A., Rothman N., Heterocyclic amine content of pork products cooked by different methods and to varying degrees of doneness. *Food Chem. Toxicol.* 36, 1998, 289-297.

- [27] Sinha R., Rothman N., Brown E. D., Salmon C. P., Knize M. G., Swanson C. A., Rossi S. C., Mark S. D., Levander O. A., Felton J. S., High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. *Cancer Res.* 55, 1995, 4516-4519.
- [28] Salmon C. P., Knize M. G., Felton J. S., Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food Chem. Toxicol.* 35, 1997, 433-441.
- [29] Knize M. G., Salmon C. P., Hopmans E. C., Felton J. S., Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 763, 1997, 179-185.
- [30] Skog K., Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure. *Food Chem. Toxicol.* 40, 2002, 1197-1203.
- [31] Turesky R. J., Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats. *Toxicol. Lett.* 168, 2007, 219-227.