

烧烤肉制品中 3,4-苯并(a)芘检测的前处理方法

万红丽¹, 周光宏^{1*}, 陈明², 徐幸莲¹, 吉艳峰¹

1. 南京农业大学教育部肉品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏 南京 210095;
2. 江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 采用超声提取、液液萃取和固相萃取联用, 建立了烧烤肉制品中 3,4-苯并(a)芘检测的前处理方法。结果表明: 烤肉样品中的 3,4-苯并(a)芘经超声处理 8 min 后用 15 mL 二甲亚砜液液萃取, 再用 C₁₈ 固相萃取柱进行净化, 回收率达到 74.98% ~ 108.82%, 相对标准偏差为 2.35% ~ 3.82%, 检测限为 0.04 μg · L⁻¹。该方法操作简单, 所需时间短, 提取效果好, 适用于烧烤肉制品中 3,4-苯并(a)芘残留检测的前处理。

关键词: 烧烤肉制品; 3,4-苯并(a)芘; 前处理

中图分类号: TS251.6⁺8 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030(2007)04-0140-04

Pretreatment methods for determination of benzo(a) pyrene in grilled meat products

WAN Hong-li¹, ZHOU Guang-hong^{1*}, CHEN Ming², XU Xing-lian¹, JI Yan-feng¹

1. Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Food Safety Research and Service Center, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: A method of pretreatment for determination of benzo(a)pyrene in grilled meat products was established. Ultrasonic extraction, liquid-liquid extraction and solid phase extraction were used. The results showed that the benzo(a)pyrene from the grilled meat was extracted for 8 min with ultrasonic wave, then extracted with 15 mL dimethyl sulphoxide and cleaned with C₁₈ column, the recovery were 74.98% - 108.82%, the relative standard deviation were 2.35% - 3.82%, and the detection limit was 0.04 μg · L⁻¹. This method fits the pretreatment for residue determination of benzo(a)pyrene in grilled meat for its easy operation, short time and good results.

Key words: grilled meat products; benzo(a)pyrene; pretreatment

3,4-苯并(a)芘 (benzo(a)pyrene, Bap) 是一种广泛存在于环境中的多环芳香族碳氢化合物 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)。肉制品中的 Bap 主要来源于加工和贮存过程, 尤其在烧、烤、熏、炸过程中, 有机物的不完全燃烧或者脂肪的高温热解均可产生不同数量的 Bap。Bap 是一种强致癌物质, 高剂量时能够引起免疫抑制, 对健康造成潜在的威胁。我国国标限定 Bap 在肉制品中的残留量应在 5 μg · kg⁻¹ 以下^[1]。Bap 在烧烤肉制品中的含量很低 (痕量级), 而且肉制品样品基体复杂, 干扰物多, 难以直接测定, 通常必须经过样品预处理后才可以进行分析。常用的前处理方法有索氏提取、超声提取、固相萃取、加速溶剂萃取等。索氏提取效果好, 回收率高, 但是操作繁琐、费时, 且所用溶剂量大, 需进一步浓缩。固相萃取是近年来发展较快的一种样品预处理技术, 国外学者已将其用于肉制品中 Bap 的提取, 通常与索氏提取或超声萃取技术联用^[2]。固相萃取可以从试样中除去对 Bap 分析的干扰物质, 富集痕量组分, 提高分析灵敏度, 以得到更好的检测结果。

肉制品中 Bap 的前处理还存在很多问题, 如处理时间长、步骤复杂、回收率不高等, 样品前处理越来越成为现代分析方法发展的瓶颈。笔者在综合分析比较现有国内外烧烤肉制品中 Bap 前处理方法^[3-5]的基础上, 将超声提取、液液萃取和固相萃取联用进行前处理, 用高效液相色谱进行测定, 对超声提取时间、固相萃取条件进行优化, 为准确、有效测定 Bap 提供理论基础。

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK2005213)

作者简介: 万红丽, 硕士研究生。* 通讯作者: 周光宏, 教授, 从事畜产品加工与质量控制研究, E-mail: ghzhou@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ALPHA1-2LD 真空冷冻干燥机 (Martin Christ, Germany), 固相萃取仪 (美国 Supelco), 高效液相色谱仪-荧光检测器 (Agilent 1100), JY92-II 超声细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), Allegra 64R 高速冷冻离心机 (美国 Beckman), RE-52A 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。0.45 μm 滤膜 Bap 标准品 (Sigma, 99%)、正己烷 (色谱纯)、乙腈 (色谱纯)、二甲亚砜 (分析纯)、氯化钠 (分析纯) 及 C_{18} 固相萃取小柱 (Waters)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准贮备液及标准溶液的配制 准确称取 Bap 标准品 10 mg, 置于 100 mL 容量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 该贮备液 (A 液) 质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 放入棕色容量瓶中备用, 避光保存。准确吸取 A 液 1 mL, 用乙腈稀释并定容至 1 000 mL, 该贮备液 (B 液) 质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 放入棕色容量瓶中备用, 避光保存。分别准确吸取一定体积的 B 液, 按试验所需线性范围用乙腈稀释定容, 配制成一系列浓度的标准工作液。

1.2.2 样品处理 取相同的电烤肉样, 切碎混匀, 称取 2 g 冷冻干燥 24 h, 磨碎, 加入 50 mL 正己烷, 超声处理 8 min, $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 将上清液旋转蒸发至 5 mL。转移至分液漏斗, 用 1~2 mL 正己烷冲洗蒸发瓶并全部转移至分液漏斗中, 用 10 mL、5 mL 二甲亚砜萃取 2 次, 将得到的下层提取液加入 25 mL 蒸馏水, 摇匀后过 C_{18} 固相萃取小柱 (用 5 mL 乙腈、10 mL 蒸馏水活化), 抽干, 用 30 mL 正己烷洗脱, 收集洗脱液蒸干, 用 2 mL 乙腈定容, 用 0.45 μm 的滤膜过滤后进行 HPLC-FLD 测定。

1.2.3 色谱条件 色谱柱为 supelco discovery C_{18} 250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm , 流动相: 乙腈和水 (体积比为 75:25), 激发波长为 294 nm, 发射波长为 404 nm, 柱温 38 $^{\circ}\text{C}$, 流速 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 20 μL , 外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 二甲亚砜的萃取效果

用正己烷超声提取 Bap 的过程中一些脂溶性物质也被提取出来, 二甲亚砜萃取的作用是除去这些脂溶性杂质, 把 Bap 分离出来。二甲亚砜的用量参照 Falcón 等^[6]的方法并进行了试验。在 5 mL 正己烷中分别加入 5、30、60 和 80 ng 的 Bap 标样, 用 10 mL、5 mL 二甲亚砜提取 2 次, 用 HPLC-FLD 测定回收率, 结果见表 1, 回收率达到 99.80%~117.32%, 表明萃取效果良好。另外, 二甲亚砜萃取时易发生乳化, 影响萃取效果, 可加几滴 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钠溶液, 以防止乳化。

2.2 固相萃取及条件选择

2.2.1 洗脱剂的选择 试验对 3 种洗脱液进行了回收率试验。用 12 mL 流动相 (乙腈和水体积比为 75:25) 作为洗脱液进行洗脱, 连续收集洗脱液并测定其中 Bap 含量, 结果表明 Bap 和杂质都主要存在于第 2~7 mL 洗脱液中, 难以达到净化的目的, 并且回收率较低, 只有 46.27%。将流动相乙腈与水的体积比改为 65:35, 用 12 mL 进行洗脱并测定收集液中的 Bap 含量。试验发现 Bap 主要存在于中间 6 mL 洗脱液中, 前面 2 mL 和后面的 4 mL 中 Bap 含量很少而杂质含量却较多, 回收率达到 109.80%。因此, 可以通过选择洗脱液的收集范围来达到净化的目的, 存在的问题是洗脱液不易浓缩。选择正己烷作为洗脱液, 洗脱效果良好, 回收率高且易进行浓缩, 因此选择正己烷作为洗脱液。

2.2.2 最佳洗脱体积 在 15 mL 二甲亚砜与 25 mL 水的混合液中分别加入 40、60 和 80 ng Bap 标样, 过 C_{18} 小柱 (5 mL 乙腈、10 mL 蒸馏水活化) 并收集测定 Bap 含量, 用正己烷洗脱小柱, 连续收集洗脱液测定 Bap 回收率。结果表明: Bap 全部保留在小柱上, 收集的洗脱液达 30 mL 时回收率为 71.68%~

表 1 二甲亚砜萃取的回收率

Bap 添加量/ng Amount added	Bap 测得量/ng Amount measured	回收率/% Recovery
5	4.99	99.80
30	35.19	117.32
60	63.57	105.96
80	84.07	105.08

注: Bap: 3,4-苯并(a)芘 Benzo(a)pyrene. The same as follows.

89.19%，继续收集 15 mL 洗脱液，Bap 回收率为 0.36% ~ 0.44%，说明 30 mL 正己烷能够将大部分的 Bap 洗脱下来，继续用正己烷洗脱，Bap 含量很少，可以忽略。试验中 Bap 上样量达到 80 ng 仍然能够全部保留在柱上，据报道烧烤肉中 Bap 的含量一般不超过 $30 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[7-9]，因此用 30 mL 正己烷洗脱固相萃取小柱完全可以对 2 g 烤肉样品进行分析。

2.2.3 固相萃取的其他操作 小柱在使用之前需要用极性溶剂如二氯甲烷等进行清洗以除去干扰物质，然后用 5 mL 乙腈和 10 mL 水活化，目的是创造一个与样品溶剂相容的环境。为了使固相萃取柱的吸附剂能保持湿润，应在吸附剂上保持 1 mL 左右活化处理溶剂。萃取过程中流速保持在 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。上样之后洗脱前要除去小柱中的水，否则会使回收率偏低，标准差变大。原因可能是在洗脱过程中，如果小柱干燥，洗脱液由于重力作用可以充满固定相的所有小孔进行充分洗脱，而当小柱中含有水时，洗脱液渗透很慢从而不能完全洗脱^[10]。

2.3 超声处理条件的优化

取相同的电烤肉样，每份称取 2 g (每个处理 4 个重复)，冷冻干燥 24 h，磨碎，按 $20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 添加 40 ng Bap 标样，加入 50 mL 正己烷进行超声处理，处理时间分别为 4、8、15、20 和 25 min，超声处理后按 1.2.2 方法进行处理，测定结果显示，Bap 回收率分别为 66.43%、98.88%、64.20%、63.50% 和 49.64%。结果表明，超声处理 8 min 时 Bap 的回收率最高，达到 98.88%，随着处理时间的延长，Bap 回收率降低，因此选择 8 min 为最佳超声处理时间。

试验中所用的超声细胞粉碎仪采用变幅杆式电压超声换能器，由于换能器输出功率较大，工作过程中易发热，不宜长时间连续工作，所以在试验过程工作 6 s 停 3 s。另外由于换能器在没有介质的情况下工作易烧坏，超声提取仪要确保提取器被介质浸没，一般以 1 cm 左右为好，提取开始时要将固液充分搅拌均匀，以减少试验误差。

2.4 回归方程、相关系数、检测限

将标准溶液依次按 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进样，以所得峰面积对相应的标准溶液质量浓度做标准曲线 (图 1)，计算标准曲线的回归方程及相关系数。试验所得回归方程为： $y = 12.591x - 0.5201$ ，相关系数 $R^2 = 1$ ，表明线性关系良好。

以能检测到 3 倍于噪音峰高的质量浓度作为最低检测限，试验中 Bap 的检测限为 $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 回收率及精密度

准确称取相同的烤肉样品 4 份，每份 2 g，其中 3 份分别按 1、5 和 10 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 添加 Bap 标准品，另 1 份不加，按 1.2.2 方法进行样品处理，每份平行测定 5 次，计算回收率和相对标准偏差，结果见表 2。

表 2 方法的回收率及精确度 ($n=5$)

Table 2 Recovery and precision of method

Bap 添加量/ng Bap amount added	本底量/ng Background	Bap 测得量/ng Bap amount measured	回收率/% Recovery	相对标准偏差/% Relative standard deviation
2	2.88	5.04	108.82	2.87
10	2.88	10.61	77.32	2.35
20	2.88	17.88	74.98	3.82

3 结论

本试验将超声提取、液液萃取和固相萃取联用对烤肉进行前处理，用高效液相色谱-荧光检测器测定 Bap 的残留量，结果表明：样品经过超声处理 8 min，15 mL 二甲亚砜进行萃取，用 30 mL 正己烷洗脱固相萃取柱，回收率达到 74.98% ~ 108.82%，精确度为 2.35% ~ 3.82%，检测限为 $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

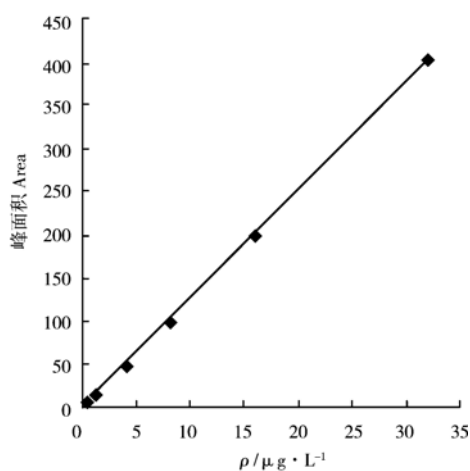


图 1 Bap 标准曲线

Fig. 1 Bap standard curve

试验分离效果好,基本消除了肉类样品复杂基质对Bap检测的干扰,完全满足检测需要。与传统的索氏提取前处理方法比较,该方法操作简单,所需时间短,符合现代分析方法高效、准确的要求,适合熏烤肉制品中Bap的残留检测。

参考文献:

- [1] 中国标准出版社第一编辑室. 中国食品工业标准汇编: 肉、禽、蛋及其制品卷 [S]. 2版. 北京: 中国标准出版社, 2003: 476
- [2] Mottier P, Parisod V, Turesky R J. Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography coupled to mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48: 1160-1166
- [3] Šimko P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives [J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 770: 3-18
- [4] Chen Jason, Chen Shaun. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons by low density polyethylene from liquid model and roasted meat [J]. *Food Chemistry*, 2005, 90: 461-469
- [5] 孙艳, 杨洪彪, 李晨光, 等. 食品中多环芳烃含量检测方法研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(11): 1319-1320
- [6] Falcón M S G, Amigo S G, Yusty M A L, et al. Enrichment of benzo [a] pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatograph-fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 753: 207-215
- [7] 李永新, 张宏, 毛丽莎, 等. 气相色谱/质谱法测定熏肉中的多环芳烃 [J]. *色谱*, 2003, 21(5): 476-479
- [8] 张莉, 李岩, 陈献文. 熏烤动物性食品中苯并(a)芘含量抽样调查分析 [J]. *哈尔滨医科大学学报*, 1996, 30(2): 145-146
- [9] Saint-Aubert B, Cooper J F, Astre C, et al. Evaluation of the induction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by cooking on two geometrically different types of barbecue [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1992, 5: 257-263
- [10] Kiss G, Varga-Puchony Z, Hlavay J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 725: 261-272

责任编辑: 沈 波