

高效液相荧光法测定“北京烤鸭”鸭皮中的多环芳烃

廖倩¹, 高振江², 张世湘³, 李开雄^{1,*}

(1. 新疆石河子大学食品学院, 新疆 石河子 832000; 2. 中国农业大学工学院, 北京 100083;

3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 采用气体射流冲击加热新技术烤制“北京烤鸭”, 对其烤制过程中可能产生的三种多环芳烃(PAHs)含量进行检测, 建立一套适合于烤鸭类高脂肪、高蛋白食品中 PAHs 的提取与检测的方法。方法: 匀浆鸭皮样品前处理采用 2mol/L KOH 甲醇-水(8:2, V/V)皂化, 异辛烷萃取, 甲醇-水(1:1, V/V)洗涤, N,N-二甲基甲酰胺-水-异辛烷(1:1:1, V/V)反萃取和 Florisil 固相萃取小柱净化, 最后进行 HPLC 分析。结果: 标品实验回收率在 83.59%~92.97%, 当样品加标水平分别为 1、2、2 $\mu\text{g/kg}$ 时, 回收率在 73.85%~80.31%, RSD < 10%, 三种 PAHs 检测量在 0.56~3.19 $\mu\text{g/kg}$ 。结论: 该方法净化效果较好, 重现性高, 检测灵敏度和准确度均满足分析要求, 样品中苯并[a]芘的含量远远低于国家规定对烟熏烧烤类食品不能超过 5 $\mu\text{g/kg}$ 的标准。

关键词: 北京烤鸭; 气体射流冲击; 多环芳烃(PAHs); 高效液相荧光检测(HPLC-FD)

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Skin of “Peking Roast Duck” by High Performance Chromatography-Fluorescence Detection

LIAO Qian¹, GAO Zhen-jiang², ZHANG Shi-xiang³, LI Kai-xiong^{1,*}

(1. College of Food, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 3. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In the process of “Peking Roast Duck” with a novel heating technique, namely air jet impingement, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) may be formed. A method of HPLC coupled with fluorescence detector was developed for the determination of PAHs in fat- and protein-rich foods, such as “Peking Roast Duck”. Homogenized duck skin samples were pretreated by using methanol containing 2 mol/L KOH-water (8:2, V/V) for saponification, isooctane for extraction, methanol-water (1:1, V/V) for washing, DMF-water-isooctane (1:1:1, V/V) for liquid-liquid partition, and Florisil solid-phase column for cleaning up. Results showed that the recoveries of benzo[a]pyrene (B[a]P), dibenzo[a,h]anthracene (DB[a,h]A) and 7,12-dimethylbenzene[a]anthracene (7,12-DMB[a]A) in blank sample at the spiked amounts of 2×10^{-8} and 1×10^{-7} g were between 83.59% and 92.97%, and their recoveries at the spiked amount of 1, 2 and 2 $\mu\text{g/kg}$ respectively, were 73.85% to 80.31%, and the RSDs were less than 10%. Their contents in roasted duck ranged from 0.56 to 3.19 $\mu\text{g/kg}$, but no these three compounds were found in raw duck. Our results suggested the high clean-up efficiency and recovery of this method and the sensitivity and accuracy of detection could meet the requirements for analysis of trace compounds in complex matrices. The B[a]P content of 0.56 $\mu\text{g/kg}$ is far less than the maximum limit value of 5 $\mu\text{g/kg}$ in the smoked and roasted foods in term of the national standards.

Key words: “Peking Roast duck”; air-jet impingement; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); high performance chromatography-fluorescence detection (HPLC-FD)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0149-04

收稿日期: 2008-07-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571312)

作者简介: 廖倩(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向为畜产品加工。E-mail: liaoqian1984@126.com

* 通讯作者: 李开雄(1952-), 男, 教授, 硕士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: lkx1956@126.com

多环芳烃(PAHs)是一类广泛存在于环境以及多类食品中的污染物,其中很多在动物实验中表现出致癌性,已经有16种被美国环境保护机构USEPA列为优先监控污染物^[1]。目前在食品中发现的多环芳烃主要有二十多种,其中大部分具有致癌活性,以苯并[a]芘、二苯并[a,h]蒽等为典型强致癌物代表^[2]。环境污染、烟熏、煎烤等是PAHs污染食品的几种途径。“北京烤鸭”因其独特的烤制方式和较高的皮下脂肪含量,在烤制过程中油脂滴落到高温燃料上热解易产生含有PAHs的烟,带来烤鸭鸭皮富集PAHs的污染问题^[3-4]。本实验采用新型加热技术——气体射流冲击烤制“北京烤鸭”,参考国外针对烟熏、烧烤肉类食品中PAHs提取检测的方法^[5-7],拟运用高效液相荧光检测建立一套适合于烤鸭这类高脂肪含量的烤制食品中PAHs的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

重量为2kg左右的冷冻鸭坯,购自北京萃华楼饭店。烤制温度:190℃,烤制时间:50min。

苯并[a]芘(B[a]P, 200 μg/ml, 溶剂:氯仿)、二苯并[a,h]蒽(DB[a,h]A, 200 μg/ml, 溶剂:氯仿)、7,12-二甲基苯并蒽(7,12-DMB[a]A, 1000 μg/ml, 溶剂:甲醇)(纯度均>99%) 美国SUPELCO公司;异辛烷、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、甲醇、氢氧化钾(KOH),硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)均为分析纯 北京化学试剂公司;乙腈(色谱纯) 德国Meker公司;Florisil固相萃取小柱(6ml/500mg) 美国Supelco公司;有机试剂经重蒸后使用。

1.2 仪器与设备

LC20-AD 高效液相色谱仪(配有RF-10AXL荧光检测器、岛津Class-VP色谱工作站及SIL-20AC自动进样器) 日本岛津公司;W201B旋转蒸发仪 上海申生科技有限公司;气体射流冲击烤鸭机、晾坯房均为实验室自行研制。

1.3 方法

1.3.1 鸭皮样品前处理

称取均质鸭皮样品50g于500ml圆底烧瓶中,加入2mol/L KOH的甲醇-水(8:2, V/V)溶液150ml, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2g,于95℃下回流6h;用300ml异辛烷分三次对皂化液进行充分萃取;分别用100ml甲醇-水(1:1, V/V)对异辛烷相洗涤,弃去甲醇-水相,合并异辛烷相;旋转蒸发仪上减压浓缩异辛烷液至50ml左右;分别加入50、50、20ml N,N-二甲基甲酰胺(DMF)至异辛烷相中进行充分萃取,保留DMF相;加120ml水至DMF相中,混合后分别加入120、120、100ml异辛烷

进行反萃取,保留异辛烷相,旋转蒸发浓缩到2ml;Florisil固相萃取小柱用20ml异辛烷:二氯甲烷(1:1, V/V)进行平衡后,上样,不收集这部分流出液,用10ml异辛烷淋洗柱子,最后用10ml苯洗脱PAHs,收集苯流出液,旋转蒸发浓缩近干,用0.5ml乙腈复溶,过0.45 μm滤膜后密封避光保存于4℃冰箱中待测。

1.3.2 色谱检测条件

色谱柱: SHIM-Pack VP-ODS (250mm × 4.6mm, 5 μm);流动相: 乙腈:水(V/V)=55:45(V/V);梯度洗脱程序:20min线性改变至乙腈:水(V/V)=80:20(V/V),维持15min,回到初始浓度;柱温:30℃;流速:1ml/min;检测器波长: $\lambda_{\text{ex}} = 290\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430\text{nm}$;进样量20 μl。以保留时间定性,外标法定量。

根据各PAH检测峰面积,通过标准回归方程计算该PAH提取液浓度为 C_{is} ,按下面公式计算样品中各个PAH的浓度: $C_i = C_{\text{is}} \times V_s/W \times 1000$ 。式中, C_i 单位为μg/kg, C_{is} 单位为ng/ml, V_s 为提取液体积(ml), W 为样品质量(g)。

2 结果与分析

2.1 色谱分离条件和检测条件的优化

根据文献资料^[2, 6-7],三种目标物性质相似,出峰时间邻近,采用梯度洗脱更有利于分离,经过对流动相组成,柱温,流速等因素不同影响的考察,确定最佳色谱分离条件见1.3.2,此时三种物质在30min内出峰完毕,分离度良好。各PAH浓度为1ng/ml的混标色谱图见图1,各保留时间如图所示。

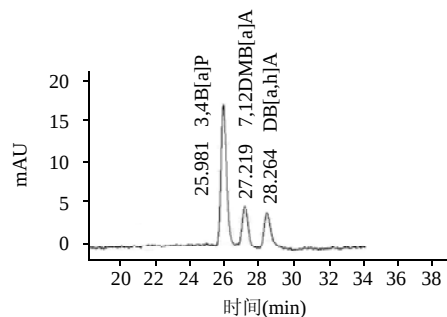


图1 PAHs标准HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed standard PAHs

2.2 提取条件的选择

肉类食品中提取PAHs,脂类物质是最主要的干扰物。针对烤鸭鸭皮样脂肪含量较高,本实验选择碱性皂化法进行前处理,并对皂化时间(5h与6h)、皂化温度(80℃和95℃)和萃取试剂(环己烷和异辛烷)等影响因素的萃取效果分别进行了比较研究。经过标品实验和鸭皮样品实验,发现短时间和低温度皂化鸭皮样品均会在液

液萃取时出现严重乳化现象, 而提高皂化温度和延长处理时间, 可以避免此现象。此现象和 Grimmer 的报道一致^[5]。考虑到实验进展的顺利程度, 而不同处理下 PAHs 的损失差异不显著, 确定样品皂化条件为 95℃回流皂化 6h。在溶剂萃取效果考察实验中异辛烷萃取效率显著高于环己烷, 选择异辛烷为 PAHs 萃取试剂。

2.3 净化柱的选择

由于肉类样品基体复杂, 萃取后仍存在较多干扰物质影响 PAHs 测定, 主要为脂肪族类化合物, 因此需经进一步净化后才能便于检测。硅胶、Florisil、氧化铝、C₁₈、Sephadex LH-20 等是常用的净化柱填料, 根据前处理方法, 本实验选择对分离脂肪族和芳香族化合物效果较好的 Florisil 作为吸附剂, 分别进行 2×10^{-8} 、 1×10^{-7} g 标品实验和鸭皮样品实验, 标品平均回收率结果见表 1, 鸭皮样品色谱图见图 2。

表 1 加标回收率(%)

Table 1 Recoveries of three PAHs in blank sample at spiked amount of 2×10^{-8} and 1×10^{-7} g (%)

标品名称	标品($\times 10^{-9}$ g)		平均值
	20	100	
B[a]P	90.56	95.37	92.97
7,12-DMB[a]A	83.92	85.87	84.40
DB[a,h]A	84.32	82.87	83.59

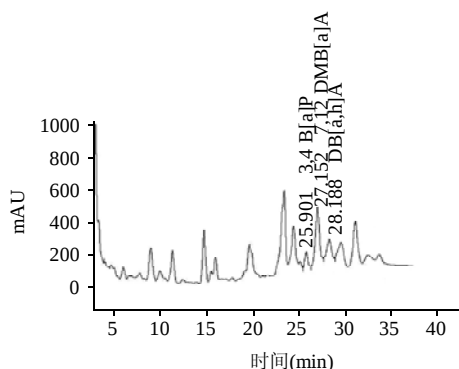


图 2 鸭皮样品 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of roast duck skin

从表 1 可以看出, 目标物回收率较高; 从图 2 可以看出经 Florisil 柱净化, 杂质较少, 且对目标物无干扰作用, 确定为合适的净化方法。在三种目标物外还有其他峰存在, 有可能为相关的多环芳烃类, 可待扩大检测对象进行验证。

2.4 标准曲线回归方程、检测限与方法精密度

本法线性范围很宽, 但实际鸭皮样品中 PAHs 的含量很低, 因此需要根据实际情况确定线性范围, 绘制标准曲线。方法检测限以 3 倍信噪比计算。取浓度为 1×10^{-8} g/ml 的 PAHs 混合标准工作液, 在 1d 内连续测定

7 次(日内), 并每隔 3d 测定一次、共测定 3 次(日间), 以 PAH 色谱峰峰面积的变异计算日内和日间相对标准偏差。各 PAH 标准曲线回归方程、检测限、RSD 结果见表 2。

表 2 标准品回归方程、决定系数、检测限及 RSD

Table 2 Regression equations, determination coefficients, within-day and inter-day precisions and detection limits of three PAHs

PAHs	标准曲线方程	R ²	RSD(%)		检测限 ($\times 10^{-9}$ g/ml)
			(日内)	(日间)	
B[a]P	$y = 2.2219x - 2.2689$	0.9992	1.37	3.13	0.18
7,12-DMB[a]A	$y = 0.7329x + 1.6053$	0.999	0.85	2.46	0.58
DB[a,h]A	$y = 0.6907x + 0.9967$	0.9988	0.75	2.18	0.63

2.5 方法的回收率与重现性

在 50g 样品中分别加入含 5×10^{-8} g B[a]P、 1×10^{-7} g 7,12-DMB[a]A、 1×10^{-7} g DB[a,h]A 的单标标准液, 分别分析加标前后样品中各 PAHs 的含量, 每样做平行测定, 计算各 PAHs 的回收率和相对标准偏差, 样品检测平均结果见表 3, 加标样品色谱图见图 3。

表 3 样品与加标样品检出结果

Table 3 Contents of three PAHs detected in 50 g of roast duck skin samples and their spike recoveries

标品名称	样品 检出量(g)	加标量 (g)	加标样品检 出量(g)	回收率 (%)	RSD (%)
B[a]P	2.85×10^{-8}	5×10^{-8}	6.304×10^{-8}	80.31	7.38
7,12-DMB[a]A	1.5954×10^{-7}	1×10^{-7}	1.9167×10^{-7}	73.85	5.19
DB[a,h]A	1.0062×10^{-7}	1×10^{-7}	1.5546×10^{-7}	77.49	9.54

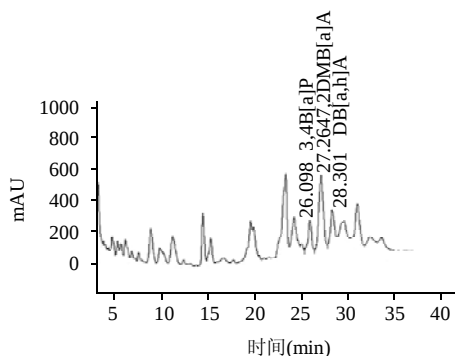


图 3 加标样品 HPLC 色谱图

Fig.3 HPLC chromatogram of spiked roast duck skin sample

从表 3 可看出, 加标回收率在 73.85%~80.31%, 相对标准偏差 RSD 为 5.19%~9.54%, 基本符合痕量物质分析的要求。

2.6 样品的测定结果

本实验所建立的方法测定了 3 只烤鸭和 2 只生鸭坯中 PAHs 的量, 每只鸭子做二次平行测定, 具体烤鸭中和生鸭坯中 PAHs 含量见表 4, 生鸭坯的色谱图见图 4。

可见排除了原料本身存在被 PAHs 污染的可能。

表4 烤鸭与生鸭坯检测结果

Table 4 Contents of three PAHs detected in roast duck and in raw duck

PAH 名称	样品检出量($\mu\text{g/kg}$)	生鸭坯检出量($\mu\text{g/kg}$)
B[a]P	0.56	ND
7,12-DMB[a]A	3.19	ND
DB[a,h]A	2.04	ND

注: ND 为未检出。

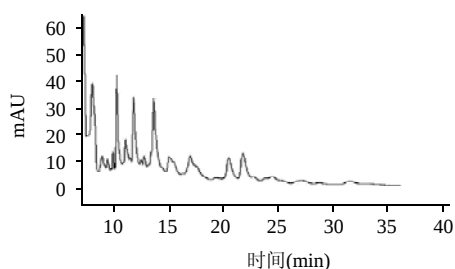


图4 生鸭坯 HPLC 色谱图

Fig.4 HPLC chromatogram of raw sample

3 结 论

本实验对气体射流冲击烤制北京烤鸭中多环芳烃的含量进行了研究,建立了适合烤鸭这类高脂肪、高蛋白含量食品物质的检测方法,本法简便,准确,样品

处理所需时间较少,净化效果良好,基本上消除了肉类样品复杂基质对 PAHs 检测的干扰。三种 PAH 化合物分离度良好,回收率和重现性符合痕量分析要求,在 190°C 烤制条件下,烤鸭鸭皮中三种高致癌性多环芳烃的含量均低于国家对 B[a]P 含量的最高标准($5\mu\text{g/kg}$),反映此烤制方法污染较低,安全性高。

参考文献:

- [1] US Environmental Protection Agency. EPA-540/5-83-006R Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution[S]. 1984.
- [2] IARC. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans[M]. Lyon: IARC, 1996.
- [3] LARSSON K B. Eegetic toxicology of the diet[M]. New York: Liss Inc, 1986: 169-180.
- [4] 王绪卿,吴永宁. 色谱在食品安全分析中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 182-185.
- [5] GRIMMER G, BOHNKE H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile analysis of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography[J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1975, 58 (4): 725-733.
- [6] DENNIS M J, MASSEY R C, MCWEENY D J, et al. Analysis of Polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets[J]. Food Chemistry and Toxic, 1983, 21(5): 69-574.
- [7] TAKATSUKI K, SUZUKI S, SATO N, et al. Liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shellfish [J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1985, 68 (5): 945-949.