



肉制品中多环芳烃前处理技术研究进展

衣海龙¹, 陈明星²

(1. 黑龙江八一农垦大学 食品学院, 大庆 163319; 2. 大庆日月星蛋白有限公司, 大庆 163319)

摘要: 多环芳烃是肉制品中常见的污染物, 具有强致癌性。肉制品中多环芳烃含量极低, 所以, 一个好的前处理方法直接关系到检测的准确度。本文综述了肉制品中多环芳烃的前处理方法, 对食品中多环芳烃的检测具有重要意义。

关键词: 多环芳烃; 技术; 前处理

Development of Sample Pretreatment Techniques for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meats

YI Hailong¹, CHEN Mingxing²

(1. HLJ August First Land Reclamation University, Food College, Daqing 163319;

2. Daqing Riyuexing Soy Protein Co., Ltd. Daqing 163319)

Abstract: The polycyclic aromatic hydrocarbon is the common pollutant in the meat, which can lead to cancer. In the meat, the polycyclic aromatic hydrocarbon content is low extremely. Therefore, a good pretreatment technique relates with the examine accuracy directly. This article summarized the pretreatment techniques in meat, which has the vital significance for the meat.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbon; technology; earlier processing

中图分类号: TS201.2 文献标识码: B 文章编号: 1001-8123(2009)05-0054-05

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, 简称 PAHs) 是指由 2 个或 2 个以上苯环以线状、角状或簇状排列的化合物。PAHs 具有脂溶性, 化学性质稳定, 不易水解, 可吸收太阳光中可见 (400nm~760nm) 和紫外 (290nm~400nm) 区的光, 对紫外辐射引起的光化学反应尤为敏感。PAHs 最突出的特性是能够引起胃、食道、皮肤等部位的肿瘤和癌变^[1-4]。目前有 16 种 PAHs 被美国 EPA (Environmental Protection Agency) 认为是优先监测污染物质, 其中 3,4-苯并(a)芘(Benzo(a)pyrene)和二苯并(a,h)蒽(Dibenz(a,h)anthracene)被 IARC (International Agency Research Cancer) 归为强致

癌物质。

多环芳烃(PAHs)是常见的污染物之一^[5], 食品中的 PAHs 来源相当广泛, 由于食品的产地环境受到污染, 以及加工方式的不当, 食品受到污染。食品中的多环芳烃主要来源于三个方面: 自然界天然存在的、环境污染造成的、食品加工和包装过程中产生的, 如食品的烤、炸、熏制等, 这也是食品中多环芳烃的重要来源。

目前, 各类食品已检测出 20 余种 PAHs, 其中以熏烤类食品污染最严重。目前许多国家已将 PAHs 列为食品有害物质监测的重要内容之一, 其中 3,4-苯并芘受到的关注最为广泛, 德国已对肉

收稿日期: 2009-01-08

作者简介: 衣海龙 (1982-4-18), 男, 研究方向: 食品营养与安全

制品中3,4-苯并(a)芘的残留,制定了限量标准1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,我国国标限定3,4-苯并(a)芘在肉制品中的最高残留量为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。PAHs在食品中存在的浓度很低(痕量级),而且有些食品基体复杂,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。食品中PAHs的前处理还存在很多的问题且操作难度大,样品前处理越来越成为现代分析方法发展的瓶颈,已经引起高度重视。高效的样品前处理方法是PAHs进行准确、有效测定分析的基础。本文对食品中PAHs预处理方法的研究进展进行了总结和评述。

1 索氏提取法

索氏提取法(Soxxhlet Extraction)作为预处理方法,在食品中残留危害物质的提取中已经广泛应用,并常作为其他方法的参照标准。索氏提取在食品中PAHs的前处理中已经应用数十年,样品经皂化后在索氏提取器中加热回流、萃取、浓缩、纯化等一系列处理后进行测定分析。索氏提取法效果好、回收率高,但是其操作繁琐、费时、且所用溶剂量大,需要进一步浓缩。

毕鸿亮等人^[6]对蔬菜中的PAHs进行检测时采用正己烷:丙酮混合溶剂(1:1)进行索氏提取,提取液经KOH皂化,硅胶-氧化铝层析柱净化后,用GC-MS对蔬菜中的PAHs进行检测。结果表明:其方法线性良好($R^2 > 0.998$),检测限较低($< 0.04 \mu\text{g}/\text{kg}$),回收率稳定(平均值为74.7~82.2%。相对标准偏差为1.1~14.6%),是测定绿色食品蔬菜中PAHs较好的方法,对于保障食品安全具有重要意义。

Pascal Mottier^[7]用索氏提取法对烤肠进行前处理,检测到16种PAHs,最低检出限为0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为96%。但也有报道称^[10]在碱性条件下PAHs中的3,4-苯并(a)芘易分解,因此索氏提取中的皂化可能对检测结果有影响。随着社会工业化发展,分析样品的批量化,目前传统的索氏提取已逐渐被自动索氏提取所替代,自动索氏提取溶剂量比传统的索氏提取少约一半并且萃取时间短。

2 超声波萃取

超声波萃取(Sonication Extraction)最先用于植物组织中PAHs的预处理,常用于中药有效成分的提取。后来在食品及环境样品中PAHs的提取中也广泛被使用。超声波萃取与其他方法相比省时、溶剂量相对较少、萃取效率高。其基本原理是超声

波在液体中振动时在溶剂和样品之间产生声波空化作用,导致溶液内气泡的形成、增长和爆破压缩,从而使固体样品分散,增大样品与萃取溶剂之间的接触面积,提高目标物从固相转移到液相的传质速率。

李永新等人^[8]在测定熏肉中的多环芳烃时采用超声波萃取技术进行前处理,优化了25种多环芳烃(PAHs)化合物的分离测定条件。将烟熏瘦腊肉剁碎混匀后用正己烷-丙酮(体积比为1:1)溶液浸泡过夜后再分别超声提取两次,每次20 min。将有机相通过氧化铝柱净化,然后进行多环芳烃的检测。结果25种PAHs回收率范围为48.5%~106.5%;日内($n=7$)相对标准偏差为3.75%~7.95%。其方法具有灵敏度高、准确度好、能同时分离测定20余种多环芳烃化合物的优点,适合于熏肉中多环芳烃化合物的分析测定。但是有研究表明^[9]在肉制品中PAHs的提取过程中,在减少干扰物质方面应用索氏提取处理比超声波提取更有效,超声波提取不适用于肉制品中PAHs的提取,但其省时、消耗溶剂少可以用于植物组织、水、油脂等样品中PAHs的提取。超声波处理的时间、强度都可能影响最终的提取效果,邓义敏^[10]研究表明超声萃取的时间影响水中3,4-苯并(a)芘的萃取效率,当超声时间为8 min时,回收率为98.7%,萃取结果最好。因此应用超声波萃取肉制品中PAHs时,应对超声萃取的时间和强度进行筛选,以得到最好的萃取效果。

3 固相萃取

固相萃取(SPE)是一种用途广泛而且越来越受欢迎的样品前处理技术,它建立在传统的液-液萃取(LLE)基础之上,结合物质相互作用的相似相溶机理和目前广泛应用的HPLC、GC中的固定相基本知识逐渐发展起来的。SPE具有有机溶剂量少、便捷、安全、高效等特点。SPE根据其相似相溶机理可分为四种:反相SPE、正相SPE、离子交换SPE、吸附SPE。

SPE大多数用来处理液体样品,萃取、浓缩和净化其中的半挥发性和不挥发性化合物,也可用于固体样品,但必须先处理成液体。目前国内主要应用在水中多环芳烃(PAHs)和多氯联苯(PCBs)等有机物质分析,水果、蔬菜及食品中农药和除草剂残留分析,抗生素分析,临床药物分析等方面。

SPE技术的原理可近似看作一个简单的色谱过程,利用固体吸附剂吸附液体样品中的目标物,使目标物与样品的基体和干扰化合物分离,然后再

用洗脱液洗脱,达到富集痕量组分,提高分析灵敏度,以得到更好的检测结果。

3.1 固相萃取的操作程序

(1) 活化。在萃取样品之前要用适当的溶剂淋洗固相萃取柱,使吸附剂保持湿润。活化的目的是创造一个与样品溶剂相容的环境并去除柱内所有杂质。通常需要2种溶剂来完成上述任务:第一个溶剂用于净化固定相,常用的有甲醇:乙腈:异丙醇等;另一个溶剂用于建立一个合适的固定相环境使样品分析物得到适当的保留,常用的是水及水溶液。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1mL左右活化处理溶剂。

(2) 上样。是指将样品溶液加入到固相萃取柱并迫使其通过固定相的过程,这时分析物和样品干扰物保留在固定相上。为了保留分析物,溶解样品的溶剂必须较弱。如果溶剂太强,会发生穿漏使得分析物不被保留,回收率偏低。

(3) 淋洗。在样液进入吸附剂中且目标物被吸附后,可先将干扰化合物洗掉,淋洗溶剂的洗脱强度是略强于或等于上样溶剂。淋洗溶剂的强度应以能尽量多的洗掉干扰组分,但又不至于洗脱任何一个分析物为最佳。若溶剂太强会将强保留杂质洗下来,使用太弱溶剂,会使淋洗体积加大。可改为强:弱溶剂混用,但混用或前后使用的溶剂必须互溶。

(4) 洗脱。淋洗过后,再用较强的溶剂将目标物洗脱下来并加以收集。用于洗脱的溶剂必须进行认真选择,溶剂太强,一些更强保留的干扰组分将被洗出来;溶剂太弱,就需要更多的洗脱液来洗脱。在选择对目标物吸附很弱或不吸附,而对干扰化合物有较强吸附的吸附剂时,可先让目标物淋洗下来加以收集,让干扰化合物保留在吸附剂上,从而实现两者的分离。

在国内,孙艳等人^[11]在研究食品中的多环芳烃时,将样品捣碎,搅拌混匀,加入200ml含12.5gKOH的95%乙醇溶液,在60℃下恒温搅拌皂化4h。皂化后的混合液经过滤后倒入分液漏斗,用异辛烷清洗残渣3次,并加入10ml盐酸。每次异辛烷萃取2次,保留异辛烷相。萃取后的异辛烷相在60℃水浴旋转蒸发仪中浓缩至5mL再以5000r/min速度离心30min,取上清液用Florisil(硅酸镁)小柱净化,用10ml苯洗脱,再将洗脱液旋转蒸发至0.1ml用乙腈定容到1ml用PVDF过滤,装入HPLC自动进样小瓶中待测。样品分析采用带有可调波长荧光检测器的液相色谱仪。结果:回收

率为80.3%、111.9%。表明该方法可用于食品中多环芳烃含量的检测。

在国外,García-Falcón^[12]等人将5g烟熏香肠均质,加入40mL正己烷加热回流3h后用二甲亚砜萃取,然后在二甲亚砜提取液中按一定比例加入水,将混合液过C18柱,用15mL乙腈与水混合液洗脱干扰物,C18柱通入N₂吹干后用正己烷洗脱,将得到的洗脱液蒸干后用乙腈定容进行HPLC测定,回收率达到78%~102%。

4 固相微萃取技术

固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)技术是20世纪90年代兴起的一项新颖的样品前处理与富集技术,它最先由加拿大Waterloo大学的Pawliszyn教授的研究小组于1989年首次进行开发研究,属于非溶剂型选择性萃取法。已由美国的Supelco公司在1993年实现商品化,其装置类似于一支气相色谱的微量进样器,萃取头是在一根石英纤维上涂上固相微萃取涂层,外套细不锈钢管以保护石英纤维不被折断,纤维头可在钢管内伸缩。将纤维头浸入样品溶液或顶空气体中一段时间,同时搅拌溶液以加速两相间达到平衡的速度,待平衡后将纤维头取出插入气相色谱汽化室,热解吸涂层上吸附的物质。被萃取物在汽化室内解吸后,靠流动相将其导入色谱柱,完成提取、分离、浓缩的全过程。固相微萃取技术几乎可以用于气体、液体、生物、固体等样品中各类挥发性或半挥发性物质的分析。发展至今短短的10年时间,已在环境、生物、工业、食品、临床医学等领域的各个方面得到广泛的应用。在发展过程中,主要涉及到探针的固相涂层材料及涂渍技术、萃取方法、联用技术的发展、理论的进一步完善和的应用等几个方面。

SPME的试验方法有四种:直接法(Di-SPME);顶空法(HS-SPME);膜保护法(Membrane-protected2SPME)^[19]。

2003年,要萍等人^[13]采用固相微萃取结合GC-MS分析方法对宣威火腿中的挥发性化合物进行了提取和分析。顶空SPME:萃取纤维头长度为10mm,涂层为聚二甲基硅氧烷,厚度为100μm,SPME萃取头先在GC进样口(220℃)预热10min,然后插入样品瓶中,使纤维头伸探至样品上部,以完成顶空成分的提取过程。控制提取的温度和时间,每个温度和时间组合重复提取3次。60℃分别提取20、40和60min以及30℃提取60min,之后用GC-MS分析,分离并鉴定出的化合物总数分别为13、

23、72 和 26 种。结果表明：在 60℃ 提取温度下，随着提取时间的延长，挥发性化合物的数量明显增加；而在提取时间相同时，较高温度下提取的化合物数量明显多于较低温度。而且在不同提取条件下，分离鉴定出的化合物种类也有明显差异，60℃ 下提取 20 min 未能检测到醇类和酮类化合物，提取时间延长至 40 min 虽然也未能检测到上述 2 类化合物，但其他化合物如醛类和烃类数量明显增多。30℃ 提取 60 min 与 60℃ 提取 40 min 所分离到的化合物数量相当，不过前者比后者多得到 2 种化合物，分别为醇类和酮类。相比之下，60℃ 提取 60 min 分离到的化合物成分最多。2004 年，张春晖^[14]对发酵香肠成熟前后的挥发性成分进行固相微萃取 - GC - MS 分析。顶空 SPME：萃取头 (Carboxen) 长度为 10 mm，涂层为适用于测定肉制品挥发性成分的聚二甲基硅氧烷 (PDMS)，涂层厚度为 75 μm。萃取头先在 GC 进样口 (250℃) 解吸 5 min，再将 SPME 针管穿透样品瓶隔垫，插入瓶中，推动手柄杆使萃取头伸至样品上部，以完成顶空吸附过程。

5 加速溶剂萃取

过去，从样品中提取多环芳烃 (PAHs) 的前处理方法需要大量的有机溶剂，例如索氏萃取需要 250~500 ml 有机溶剂。新近颁布和即将出台的环保法规对实验室使用有机溶剂在许多方面作出了严格的限制。为了适应这种变化，加速溶剂萃取作为减少溶剂消耗量的固体样品前处理技术也随之产生。

加速溶剂萃取 (Accelerate Soluble Extraction, ASE) 是用溶剂对固体、半固体的样品进行萃取的技术。选择合适的溶剂，通过增加温度 (40℃~200℃) 和压力 (6.89 MPa~20.67 MPa) 来提高萃取过程的效率。虽然加速溶剂萃取是近两年才发展起来的新技术，但由于 ASE 具有安全、快速、自动、溶剂用量少、萃取效率高、重复性好、样品基体影响小等优点，符合现代分析检测技术的发展趋势。已被美国环保总局 (EPA) 推荐为标准方法，已在环境、药物、食品和聚合物工业等领域得到广泛应用，特别是在残留检测方面，被用于土壤、污泥、沉积物、粉尘、动植物组织、蔬菜和水果等样品中的 PCB、多环芳烃、有机磷杀虫剂 OPP (或有机氯杀虫剂 OCP)、农药、苯氧基除草剂、三嗪除草剂、柴油、总石油烃、二恶英、呋喃等有害物质的萃取。

1996 年美国 Dionex (戴安) 公司推出了 ASE 系列加速溶剂萃取仪，主要由溶剂瓶 (带有多元溶

剂自动混合器)、泵、气路系统、加温炉、不锈钢萃取池和收集瓶组成。开发出了 ASE100、ASE200、ASE300 等，是对分析中的样品前处理技术的一次改革。美国 EPA (美国环保总署) 已经将美国 Dionex 公司 ASE 萃取仪作为标准方法代替索氏提取。我国国标 GB/T19649-2005 中，ASE 被确认为“粮食中 405 种农药多残留检测方法”中指定提取用仪器，并且该提取方法在 Dionex 公司的 34 mL 萃取池的 ASE300 上完成。

加速溶剂萃取技术在国外应用报道很多，在国内是从近些年才发展起来的一项技术，主要是在蔬菜、土壤等中的农药残留检测中见报道，在食品、肉制品中的应用并不多见。

崔艳红等人^[15]采用室内实验方法，1:1 二氯甲烷和丙酮为提取剂，使用加速溶剂萃取仪，研究了北京市市场蔬菜中多环芳烃和有机氯化物的提取和测定方法。考察了快速溶剂提取的提取条件、样品净化方法和 GC - MS 测定条件。前处理阶段，样品用自来水洗净后在烘箱内烘干，用不锈钢粉碎机搅碎，分析前于 4℃ 冰箱中存放。取 5 g 样品装入萃取池中，提取温度为 120℃，压强为 1.03×10^3 Pa，静态提取 5 min。其后用溶剂快速冲洗样品，氮气吹扫收集全部提取液。结果表明：用 1:1 二氯甲烷、丙酮和加速溶剂提取仪在 120℃ 提取 5 min，经氟罗里硅土柱净化后用 GC - MS 测定可以得到很好的效果。方法回收率在 42%~124% 之间，且重现性较好。

美国 DIONEX (戴安) 公司中国应用研究和技术服务中心在使用加速溶剂萃取仪萃取环境样品中的多环芳烃 (PAHs) 时表明：与原有的从固体废弃物中提取多环芳烃的传统方法比较，加速溶剂萃取更方便、快速、回收率高、溶剂用量少，其重现性与索氏萃取和超声波萃取相当。在萃取土壤、海床沉积物等固体废弃物中的多环芳烃时，在前处理阶段，样品装入萃取池前需要干燥和研磨，所需样品量应保持在 10~20 g。含水量超过 10% 的样品应加入等量的 Na_2SO_4 混合。粘性、油性或纤维状等不适于研磨的样品应处理成小块以保证尽可能大的萃取面积。这类样品需要研磨时，需按 1:1 的比例加入无水 Na_2SO_4 ，以改善研磨效果。不同样品量需用不同体积的萃取池。结果表明，加速溶剂萃取与索氏提取法的回收率基本一致。

加速溶剂萃取的缺点：对于用极性溶剂萃取的含水样品，当用无水 Na_2SO_4 作分散剂时，若提

取温度较高,当仪器冷却时有管路堵塞发生,原因可能为极性溶剂在高温高压下对无水 Na_2SO_4 的溶解度增加,当降低温度时,溶解度降低,易析出 Na_2SO_4 晶体从而堵塞管路。此时建议用硅藻土分散样品而不用无水 Na_2SO_4 ,对于含水的样本可以加无水 Na_2SO_4 于收集瓶中除水。

5 结束语

目前随着社会对食品安全问题的关注,食品中 PAHs 的污染已成为世界各国广泛关注的问题。对食品中的 PAHs 的检测更要求高效、快速、准确。随着社会工业化程度的提高和检测技术的发展,PAHs 的前处理方法将会向着更加快速、高效、自动化和微量化,并与各种检测分析设备如: HPLC、GC-MS 等相连接的方向发展,有利于食品中 PAHs 的准确检测和控制其污染、危害。

参考文献

- [1] 段小丽,魏复盛.苯并(a)芘的环境污染、健康危害及研究热点问题[J].世界科技研究与发展,2002,24(1):11~17.
- [2] 周泽义,牟耀波,王敏建.中国食品中 B(a)P 污染和控制[J].环境污染治理与设备,2000,5(1):66~71.
- [3] 王桂山,申兆庆,王福涛.PAH(多环芳烃)的危害及产生的途径[J].山东环境,2001,(2):41.
- [4] 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.
- [5] 袁彦华,孙连军,郭秀兰.多环芳烃化合物环境污染研究[J].环境与健康,1999,(5):16~31.
- [6] 毕鸿亮等.绿色食品蔬菜中多环芳烃分析方法研究[J].广东省土壤学会第九次会员代表大会暨学术交流年会论文集,2006:102~108.
- [7] Pascal Mottier, Veronique Parisod, and Robert J. Turesky. Quantitative Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Barbecued Meat Sausages by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry[J]. J. Agric. Food Chem. 2000, 48: 1160~1166.
- [8] 李永新,张宏,毛丽莎,孙成均.气相色谱/质谱法测定熏肉中的多环芳烃[J].色谱,2002(9):476~479.
- [9] Chen B H, Wang Y S, Chiu C P. Evaluation of Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Meat Products by Liquid Chromatography[J]. J. Agric. Food Chem. 1996, 44: 2244~2251.
- [10] 邓义敏.超声萃取在水样中苯并(a)芘分析中的应用[J].昆明理工大学学报,1999,24(5):124~126.
- [11] 孙艳等.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.
- [12] Garcia-Falcón MS, Simal-Gándara J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from different wood and their transfer during traditional smoking into chorizo sausages With collagen and tripe casings[J]. Food Additives and Contaminants, 2005, 22(1): 1-8.
- [13] 要萍等.运用顶空固相微萃取技术分析宣威火腿中的挥发性化合物[J].研究报告,2003(10):1-5.
- [14] 张春晖.发酵香肠成熟前后的挥发性成分进行固相微萃取-GC-MS分析[J].分析测试学报,2004(6):40-44.
- [15] 崔艳红,巨天珍,曹军,等.多环芳烃和有机氯化物[J].农业环境科学学报,2003,22(3):364-367.
- [16] Perez G, Lilla E, Cristalli A. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ionizing
- [17] Pitts J N. Formation and fate of gaseous and particulate mutagens and carcinogens in real and simulated atmospheres[J]. Environ. Health Perspect, 1983, 47: 115~14.