

荧光分析法测定食品中的3,4-苯并芘

一、前言 3,4-苯并芘(BaP)是多环芳烃中有代表性的强致癌物。煤焦油、沥青中含有大量的BaP(最多含3%),煤炭、石油、天然气和木材等燃料的不完全燃烧,是BaP的主要来源^[1]。食品的烟熏、油炸、烘烤等加工,在工艺条件不合理时,常易使食品染上BaP,贮运条件不好,也会使食品受BaP污染。我国现时尚无BaP的食品卫生标准,在国际贸易中,一些国家以1ppb为食品卫生标准。

测定BaP的方法,现有荧光法^[3,4,5]、紫外分析法^[6]、气相色谱法^[7]、液相色谱法^[8]、薄层层析、薄层扫描、质谱法等。其中荧光分析法灵敏度和重现性均比较理想。本实验的灵敏度为0.0001微克/毫升、检出限为0.001ppb、回收率在80%以上。

二、测量原理 BaP易溶于有机溶剂,用适当的溶剂将BaP从样品中提取出来,并用碱将提取液中的脂肪类物质皂化,经液-液分配、柱层析、纸层析等分离提纯,利用BaP在紫外线下产生的特征荧光光谱,可进行定性,并利用其发射光谱的峰值,用基线法可定量计算BaP含量。

三、仪器 岛津RF-510荧光分光光度计(日本);紫外分析仪(上海、波长为365nm);K.D.浓缩器;组织捣碎机;索氏脂肪提取器;层析柱(ϕ 1.5~2厘米 \times 35厘米);圆层析缸(ϕ 6厘米 \times 24厘米)及实

验室常用仪器。

四、试剂 95%乙醇(二级);氢氧化钾(二级);60~90°C石油醚(重蒸);无水硫酸钠(二级);环己烷(二级,经硅胶处理);苯(二级、重蒸)硅胶(60~100目,经135°C活化四小时);中性氧化铝(100~200目,经135°C活化四小时);无水乙醇(二级);二氯甲烷(二级);醋酸酐(二级);硫酸(二级);磷酸(一级);甘油淀粉润滑剂;甘油、可溶性淀粉以33:9的重量混合,微火加热成透明状,冷却装瓶待用。

BaP标准液的制备:将5毫升1微克/毫升的贮备液,用环己烷稀释至100毫升,配成0.05微克/毫升的BaP标准液。

五、操作步骤

1. 提取

1) 鱼、肉类食品的提取:称取100克经组织捣碎机混匀的样品(BaP含量超过1ppb的样品,取50克或更少即可),置于50毫升磨口三角瓶中,加入100毫升95%乙醇,15克氢氧化钾(视样品脂肪量的多少,适当增减),在95°C水浴中回流提取三小时,将提取液用脱脂棉过滤至分液漏斗中,用150毫升石油醚,分三次洗涤三角瓶,并一并转入分液漏斗中,再加150毫升蒸馏水,振摇、静置,下层水液放入另一

理。所采用的方法应不造成蛋白混浊。油处理和洗净操作必须符合条例中规定的卫生要求。

4. 鸡蛋在收集起来后,应迅速冷却到60°F(33°C)或低于60°F(33°C),并保持在不超过60°F的相当稳定的温度,和大约70%的相对湿度下。但是在洗涤和包装过程中,鸡蛋温度会升高到70°F(39°C),鸡蛋应迅速移至冷却槽,或转移至温度60°F或低于60°F的环境下。

5. 应避免在蛋壳“出汗”(蛋壳表面出现小水珠)的情况下进行运输和管理。

6. 鸡蛋贮存温度应不超过60°F(33°C)。

7. 应定期检查并测定由政府分级员制订的生产与分配计划的正确性。

苏锡田 编译自美国《Eggs Grading Manual》

美国鸡蛋质量管理方案

美国农业部(USDA)根据广泛的研究和统计分析,于1950年起实施一项质量管理方案。此方案的实施,促进了“鲜特级”或AA级检定标签的高质量鸡蛋的生产和销售。

USDA质量管理方案规定,从鸡蛋生产到被消费者购买为止整个期间,必须符合质量等级要求。以下要求适用于农场和零售店。

1. 来自每一批的鸡蛋应分别包装,并在装运箱上打上标志,以利于包装站分类。龄期不超过60天的组成一批。

2. 鸡蛋从巢中收集,至少每天两次,最好三次。

3. 要求洗净的鸡蛋,应按照USDA带壳鸡蛋分级条款进行洗净。鸡蛋可采用油浸洗法或油喷洗法处

分液漏斗中，加入100毫升石油醚再萃取一次，弃去水液，合并二次石油醚萃取液，用蒸馏水洗三次，每次用水150毫升，洗后的提取液用无水硫酸钠脱水四小时以上。

2) 酒类和水的提取：直接用石油醚萃取。

3) 糖块的提取：将糖块捣碎，用适量水溶化后按1)操作。

4) 并干的提取：在环己烷处理过的滤纸筒中称取50克研细的并干样品，置于索氏提取器中，用180毫升95%乙醇和6克氢氧化钾在95°C水浴中回流提取8小时后，按1)操作。

2. 柱层析：

1) 浓缩：将脱水后的萃取液在水浴上减压浓缩至2~3毫升。

2) 装柱：在层析柱的下口，放入少量脱脂棉。加入少量环己烷并用玻璃棒将棉花中的气泡赶出。取10克硅胶于小烧杯中，加入30毫升环己烷搅拌至无气泡后，湿法装柱，柱中环己烷的液面高于硅胶柱面约3公分时，加入3克中性氧化铝，当环己烷液面接近氧化铝柱面时，关掉下面活塞。

3) 过柱：将石油醚浓缩液全部移入柱内，过柱速度控制在2毫升/分，过柱液流完后，用60毫升苯淋洗层析柱，淋洗液用100毫升梨形瓶接收，用K.D.浓缩器减压浓缩至0.5毫升左右。

3. 纸层析：

1) 乙酰化纸的制备：将层析纸裁成5×20厘米的纸条，浸入盛有360毫升苯、260毫升醋酸酐、0.2毫升浓硫酸配制液的层析缸中，不断搅拌，4小时后，

静置过夜。(或水浴40°C，6小时并经常搅拌)、取出纸条，在通风柜内晾干，蒸馏水洗2~3次，晾干后放入无水乙醇中浸泡4小时，取出晾干，压平备用。

2) 点样：在乙酰化纸的一端，右侧约4厘米处，用铅笔轻轻划一横线，用玻璃毛细管将浓缩液以线状点样法全部点在横线以上(参见图1)。点完后用环己烷洗涤梨形瓶五次，每次约0.5毫升，并将洗涤液点于同位。另在横线左侧点一点BaP标准液以示定位。

3) 展开：将点样后的乙酰化纸的上端挂在圆层析缸盖的挂钩上，层析缸内加入30毫升无水乙醇和15毫升二氯甲烷作为展开剂，令乙酰化纸的下端约2厘米浸入展开剂中，置避光处，待展开剂前沿上升到距纸顶1厘米时取出晾干。重复展开2~3次后，在365nm紫外灯下，用铅笔圈出与BaP标准点Rf值相应位置

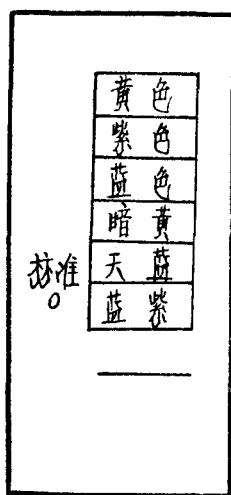


图 1

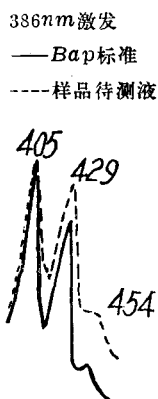


图 2

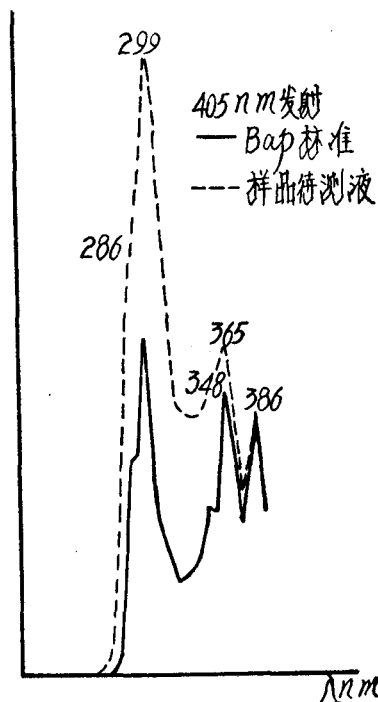


图 3

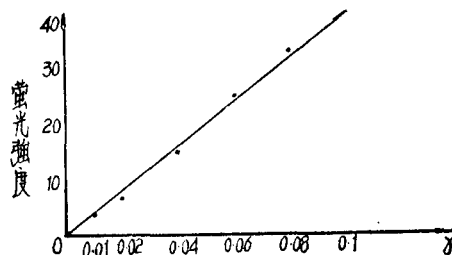


图 4

上的荧光色带(图1),剪下圈出部分并分别剪碎,放入带塞的试管中,加5毫升苯,在60°C水浴上加热20分钟,其间须摇动1~2次,将BaP浸出,冷却后上机测定。

4. BaP标准的制备:用BaP标准液,按上述方法在层析纸上展开并制出标准样。

5. 测定

1) 定性:把RF-510荧光分光光度计的激发波长固定在386nm,激发和发射的狭缝均为5nm,对待测液和标准液分别在发射波长500~350nm间扫描,得出荧光光谱(图2)。再将发射波长固定在405nm,对激发波长在400~250nm间扫描,得出激发光谱(图3)。对照图谱,相同时即可确定为BaP。

2) 定量:将激发波长固定在386nm,分别测定405nm,400nm,410nm荧光强度,用基线法求出在405nm处的峰值I:

$$I = I_{405} - \frac{1}{2} (I_{400} + I_{410})$$

再与标准液比较,求出BaP的实测量Y:

$$Y = \frac{I_1}{I_0} \times Y_0$$

式中: I₁ = 待测液的荧光强度

I₀ = 标准液的荧光强度

Y₀ = 标准液BaP含量(微克)

再按取样量的多少换算成每公斤样品中BaP的含量(ppb):

$$X_{(ppb)} = Y \times \frac{1000}{G}$$

式中G是取样量(克)。

六、讨论

1. 样品中的BaP含量是ppb级,任何外来的微量BaP的引入,都会影响结果的准确性。因此对试剂的

纯度和用具的要求很高。试剂一般可用365nm紫外光检测是否含荧光物质,必要是可做BaP定性测试。凡士林中含有荧光物,不能用作活塞润滑剂。所有脱脂棉也要用有机溶剂处理,除去其荧光物质。

2. 实验室温度低于15°C时,过滤、萃取,过柱和展开均会有困难,易引起乳化。室温超过35°C溶剂挥发快,BaP令残留在器壁上,令使结果偏低。25°C左右的室温最为理想。

3. BaP在10%氢氧化钾乙醇溶液中加热3小时,不会产生任何变化。对于脂肪含量高的样品,可先用二甲基甲酰胺法来处理。或是氢氧化钾分两次加入,不使超过10%,以免BaP发生变化而影响测定结果。

4. 在液-液分配萃取和水洗时,可能会发生乳化现象。为防止乳化,可先加几滴磷酸。若已发生乳化,可用电吹风加热,加入少量无水硫酸钠或1:1的乙醇水溶液等方法破乳。

5. 柱层析时,盛浓缩液的容器需用环己烷洗涤多次,一般用20毫升环己烷洗涤为宜,用量过多,可能把一部分BaP洗去。在湿法装柱时,改用石油醚代替环己烷,则试剂可回收利用。

6. 乙酰化纸层析法比薄层层析法操作简便,不易损失,但要用毒性较大的苯来浸出BaP,是美中不足处,本实验用石油醚作萃取剂,而不用萃取能力更强的苯或氯仿,就是出于毒性考虑的。

7. 根据在溶液浓度很稀时,产生的荧光强度与溶液浓度成正比的性质,本试验用定点直接比较法来计算试样中BaP的含量,其结果与工作曲线法十分接近(表3)。因影响荧光强度的因素很多,各次测定条件很难完全一致,实际上不可能作一条工作曲线而一劳永逸,每次都作工作曲线又相当不方便,因此本实验采用定点直接比较法。

定点直接比较法与工作曲线法(图4)的结果比较表

样 品	BaP标准 点量	定点直接比较法 BaP 实测值(微克)					工作曲线法BaP实测值	
		0.01	0.02	0.04	0.06	0.08		0.1
油炸肉元		0.0177	0.0207	0.0191	0.0168	0.0167	0.0177	0.0178(微克)

8. 从测试结果来看,几乎所有的食品或多或少地含有BaP,少数品种的BaP含量超过1ppb。在烟熏、油炸食品中,BaP含量不都是很高的。如何设法降低

食品中BaP含量,有待研究。

张旦民