

高效液相色谱-质谱串联法检测中餐常见肉类中杂环胺含量

李青¹, 王亚南², 秦之皓¹, 王学东¹, 彭利娟¹

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023)

(2. 南京医科大学附属苏州市立医院临床实验室, 江苏苏州 215002)

摘要: 本文通过优化液液萃取和固相萃取, 结合高效液相色谱-质谱串联法对肉制品中的杂环胺进行分析测定。该方法对肉制品中六种杂环胺的检出限和定量限分别低至 0.0006 ng/g 和 0.0021 ng/g。应用该方法研究了常见烹饪方式(烘烤和油炸)对大众餐桌上最常见肉品(鸡肉、猪肉、牛肉、草鱼)中杂环胺形成的影响。结果表明, 相同烹饪方式处理的肉制品中杂环胺的生成量随烹饪温度的升高而增加; 在相近加工温度下, 油炸烹制的肉和鱼会产生较烘烤处理更多的杂环胺。烘烤和油炸烹制的肉制品中含量最高的杂环胺分别是 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶(PhIP)和 2-氨基-3,8-二甲苯咪唑并[4,5-f]喹啉(MeIQx)。相同烘烤烹制条件下(275℃), 烤鸡肉中产生的杂环胺总含量最高, 其次是烤猪肉, 草鱼和牛肉。275℃下烘烤烹制的鸡肉中检出最高含量的 PhIP(341.15 ng/g)。在相同的实验用油炸烹制条件下, 油炸肉类和鱼类中杂环胺含量处于相对较低的水平, 相互之间略有差异; 于 200℃的油炸牛肉中检测出最高含量 MeIQx(7.44 ng/g)。

关键词: 杂环胺; 肉; 鱼; 烘烤; 油炸

文章编号: 1673-9078(2020)08-354-364

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.0103

Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines in Common Meat Types for Chinese Cuisines by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Qing¹, WANG Ya-nan², QIN Zhi-hao¹, WANG Xue-dong¹, PENG Li-juan¹

(1.College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China) (2.Department of Clinical Laboratory, Suzhou Municipal Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China)

Abstract: Heterocyclic aromatic amines (HAAs) in meat products were analyzed by optimizing liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of the six HAAs in meat products were as low as 0.0006 ng/g and 0.0021 ng/g, respectively. The effects of common cooking methods (oven roasting and deep-frying) on the formation of HAAs in the most common meat products (chicken, pork, beef, grass carp) were studied. The results showed that the formation of HAAs in meats and fish by the same cooked method increased with the increased processing temperature; deep-frying treatment of meats and fish produced more HAAs than oven roasting treatment when similar processing temperatures employed. 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) and

引文格式:

李青,王亚南,秦之皓,等.高效液相色谱-质谱串联法检测中餐常见肉类中杂环胺含量[J].现代食品科技,2020,36(8):354-364

LI Qing, WANG Ya-nan, QIN Zhi-hao, et al. Analysis of heterocyclic aromatic amines in common meat types for Chinese cuisines by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 354-364

收稿日期: 2020-02-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21405118)

作者简介: 李青 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 彭利娟 (1974-), 女, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全

2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinolone (MeIQx) were the most abundant HAAs formed in roasted and deep-fried samples, respectively. When meats and fish were roasted at the same temperature (275 °C), roasted chicken contained the highest amount of total HAAs, followed by roasted pork, grass carp and beef. The highest concentration of PhIP was detected in roasted chicken cooked at 275 °C, up to 341.15 ng/g. Whereas, deep-fried meats and fish treated at the same temperature exhibited slight differences in total HAAs at relative low levels. The highest concentration of MeIQx (7.44 ng/g) formed in deep-fried products was found in fried beef cooked at 200 °C.

Key words: HAAs; meat; fish; roasting; deep-frying

杂环胺 (Heterocyclic aromatic amines, HAAs) 是一类富含蛋白质肉类经高温加热形成的具有致癌和致突变危害的化合物^[1]。迄今为止, 已经从食品中分离和鉴定出超过 25 种 HAAs, 更多存在于红肉及鱼肉中。流行病学研究表明, 经常食用含有 HAAs 的肉制品会增加患结肠癌、直肠癌和前列腺癌的风险^[2,3]。HAAs 在高温烹制的家常肉 (牛肉、鱼肉、猪肉、鸡肉) 中均存在, 不同品种肉的不同部位产生的 HAAs 含量存在差异。根据其形成温度, HAAs 大致可分成两大类: 含有氮-甲基-2-氨基咪唑部分且在 150 °C 或更高温度下加热形成的, 称为 IQ 型 HAAs, 如 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶 (PhIP), 2-氨基-3,4-二甲基咪唑并[4,5-f] 喹啉 (MeIQ), 2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (MeIQx), 2-氨基-3,4,8-三甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (4,8-DiMeIQx) 和 2-氨基-3,7,8-三甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (7,8-DiMeIQx) 等; 另一类 HAAs 是在 250 °C 以上高温通过谷氨酸或色氨酸的直接热裂解形成的, 称非 IQ 型 HAAs^[3,4], 如 2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶 (AaC) 等。

目前, 对于影响 HAAs 形成的因素已经有了广泛的研究, 主要集中于肉的类型, 烹饪方法, 水分含量, 脂肪含量, 所添加香料等因素^[5]。然而, 由于各研究所采用的烹饪条件存在一定的差异, 不同影响因素的协同效应及相互干扰加大了各研究的横向对比和评估的难度。在我国, 食用肉类体系复杂, 加工工艺繁多, 不同肉制品中 HAAs 的含量差异颇大, HAAs 的定量分析检测方法需要进一步优化。猪肉, 鸡肉, 牛肉和鱼肉是每个中国家庭的日常餐桌上的常见菜品, 是人们日常饮食摄入蛋白质的主要途径。在过去的三十年中, 猪肉, 牛肉和鸡肉的消耗量迅速增加。从 1985 年到 2014 年, 肉类总产量增长了 344%^[6]。因此, 关于家常肉中致癌物质的检测鉴定也受到越来越多的关注。与此同时, 中国作为世界烹饪大国之一, 有关肉类烹饪方法多种多样。而烧烤和油炸是全国最常用的烹饪方法, 且烤肉及油炸食品由于其特殊的风味、口感深受当代青少年及年轻人的喜爱, 对于这两种常见烹饪方式与人们健康影响的评估也显得尤其重要。

我国目前对于多种家常肉 (牛肉、鱼肉、猪肉、

鸡肉) 中 HAAs 含量的系统研究相对较少, 且我国目前也尚未出台食品中 HAAs 的允许限量标准。但人们对肉制品中 HAAs 关注在逐步增强。本研究旨在通过优化液液萃取-固相萃取联用法提取纯化 HAAs 及高效液相色谱-质谱串联法 (HPLC-MS/MS) 检测牛肉, 鱼肉, 猪肉和鸡肉经过烘烤和油炸两种不同加工方法形成的 HAAs 含量的变化, 以此对常用烹饪方式和烹饪条件进行评估, 帮助人们减少日常生活中致癌物 HAAs 的摄入。同时, 也为日后评估人体 HAAs 的摄入量与结肠癌、直肠癌及前列腺癌等相关疾病风险之间的联系提供理论基础及参考依据。

1 材料与方法

1.1 标准品与试剂

PhIP、AaC、MeIQ、MeIQx、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx、2-氨基-1-[²H₃]-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶 ([²H₃]-PhIP, 同位素纯度为 99%) 和 2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶-¹⁵N₃ (¹⁵N₃-AaC, 同位素纯度为 99%) 购于 Toronto Research Chemicals 公司。液相色谱用流动相为 Thermo Fisher Scientific 公司的液相色谱质谱级溶剂。二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO), 乙酸乙酯均为高效液相色谱级, 购于阿拉丁化学试剂有限公司。其他所有试剂均为分析纯, 来源于国药化学试剂有限公司。Extrelut-N20 液液萃取柱及硅藻土购自 Merck 公司。Oasis MCX 固相萃取 (SPE) 柱 (150 mg, 6 mL) 购于 Waters 公司。

1.2 主要实验仪器

Evolution 220 扫描型紫外可见分光光度计, 美国热电公司; Q Exactive 高分辨率质谱仪, 美国 Thermo 公司; ZLS-1 真空离心浓缩仪, 湖南赫西仪器装备有限公司; KQ2200DV 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; MX-S 漩涡混匀仪, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; FSH-2A 高速均质机, 上海康敏检验设备有限公司; Milli-Q 超纯水机, 美国 Millipore 公司; RJ-81 炸炉全系列, 广州佛洛丽斯厨具设备有限公司; GRC36 烤箱; 中山市博西德电器有

限公司; BSA124S-CW 电子天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司; 固相萃取装置, 美国安捷伦科技有限公司。

1.3 实验原材料及加工过程

本研究中所有肉类原材料均购自当地的超市。牛肉、鸡肉和猪肉均为无骨不带皮瘦肉, 分别取自臀部、胸部和腰部; 草鱼样本取自腹背部, 无骨带皮。所有肉样均使用烘烤和油炸两种烹饪方式进行加工。电烤箱和油炸锅在样品烹制前均预热 10 min, 以达到所需烹饪温度。烘烤用肉样切成块 (长 8 cm×宽 4 cm×厚度 1 cm), 分别在 225、250 和 275 °C 的温度下烤制 15 min (7.5 min/面); 对于油炸加工方式, 肉样切碎食盐腌制 30 min (食盐添加量为样品量的 2%), 随后塑型为圆型肉饼状 (直径 6 cm×厚度 0.8 cm), 然后在不同温度 (160、180 和 200 °C) 下油炸 3 min (1.5 min/面)。所有肉样成品均已达到可食用程度。考虑到其他因素可能对 HAAs 的生成量产生影响, 在烹调过程中未添加香辛料, 食品添加剂等佐料。烹饪完成的肉样切成小颗粒状并混匀备用。

1.4 实验方法

1.4.1 HAAs 的提取方法

HAAs 的提取和纯化依据文献方法^[7-9]进行了优化。简而言之, 称取 2 g 肉样, 加入 10 mL 1 mol/L 氢氧化钠, 常温匀浆 1 min。加入 4 ng 有同位素标记的内标 ($[^2\text{H}_3]$ -PhIP 和 $^{15}\text{N}_3$ -AaC), 常温超声 20 min。超声后的匀浆液与硅藻土 (8 g) 于烧杯中充分混合, 随后均匀装填到下端连接 Waters Oasis MCX 柱的空 Extrelut-N20 柱内。在填柱前, MCX 柱预先用乙酸乙酯 (2 mL) 进行洗涤平衡。装填完成后, 0.1 mol/L 盐酸 (2 mL) 和甲醇 (2 mL) 用于洗涤杂质, 最后用氨水-甲醇溶液 (1:19, 2 mL) 洗脱目标 HAAs。洗脱液在 45 °C 下真空浓缩至全干。上机分析前, 用 200 μL

50% DMSO 复溶。

1.4.2 原材料的化学组成测定方法

根据国标推荐的方法^[10], 取 3 g 切碎的牛肉在 105 °C 的烘箱中干燥 5 h, 测定其水分。蛋白质含量通过国标中燃烧法直接测量^[11]。使用 6 mol/L 盐酸将四种牛肉进行酸水解, Hitach L-8500 自动氨基酸分析仪分析测定氨基酸含量^[12]。

1.4.3 HAAs 的定性定量分析方法

Thermo UltiMate 3000 HPLC 系统用于 HAAs 液相色谱分析。液相分析柱为 Thermo Aquasil C18 反相柱 (3 μm 粒径, 2.1×150 mm)。流动相 A 相为 0.01% 甲酸, 5% 乙腈的水溶液; B 相为 0.01% 甲酸, 5% H_2O 的乙腈溶液。流速设置为 0.2 mL/min, 起始状态为 100% A, 在 1 min 内以线性梯度降至 25% B, 1~7 min 保持 25% B, 7~10 min 时以线性梯度升至 100% B 并保持 2 min。质谱分析在 Thermo 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (Q Exactive) 上进行。选择反应监测 (Selective reaction monitoring, SRM) 扫描模式; 质量扫描范围 m/z 150~600; 最大进样时间 100 ms; 加热电喷雾电离源 (Heated electrospray ionization, HESI); 正离子模式; 鞘气流速为 25 mL/min; 辅助气体流速为 15 mL/min; 喷雾电压为 3.2 kV; 毛细管温度为 320 °C。HAAs 的定量特征离子、保留时间 (t_R) 及其碰撞能如表 1 所示。目标物的色谱峰峰型对称、无干扰因素时, 保留时间为目标物定性的判定依据; 目标物的色谱峰峰型不对称、且有干扰因素时, 根据保留时间及二级质谱图对目标物进行定性; 根据定量离子的色谱峰面积进行定量。Xcalibur 4.0 版软件用于数据采集及数据分析。采用内外标法进行 HAAs 定量计算。该外标准曲线范围从 0.5~1000 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 检测了七个标准品浓度水平 (0.5、1、5、25、100、500、1000 $\text{pg}/\mu\text{L}$), 样品中内标浓度均为 200 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 。MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx 和 7,8-DiMeIQx 没有相应的同位素标记的内标, 使用 $[^2\text{H}_3]$ -PhIP 内标进行计算。

表 1 杂环胺的定量特征离子及质谱参数

Table 1 The SRM parameters for six HAAs and internal standard

杂环胺种类	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能 NCE/%
PhIP	9.7	225.11	210.09	80
AaC	12.3	184.10	167.00	80
MeIQ	6.5	213.11	198.10	32
MeIQx	6.9	214.10	199.10	32
4,8-DiMeIQx	7.5	228.11	213.10	80
7,8-DiMeIQx	7.4	228.11	213.10	80
$[^2\text{H}_3]$ -PhIP (内标)	9.7	228.11	210.09	80
$[^{15}\text{N}_3]$ -AaC (内标)	12.3	187.00	169.00	80

1.4.4 数据分析方法

在本次研究中,采用完全随机设计(每个样品平行测定三次)。实验数据表示为平均值±标准差(SD),并使用 SPSS statistics 19.0 软件的单因素方差分析(ANOVA)和Dunn多重比较进行数据分析,以确定样本值之间的显著差异。

2 结果与讨论

2.1 原材料的化学组成

生肉及鱼的水分含量与蛋白质含量见表2。每个样品平行测定三次,不同肉品种的水分含量和蛋白质含量存在显著差异($p<0.05$)。生草鱼的水分最高(78.14%),其次是生牛肉(75.50%),生猪肉和鸡肉中的水分分别为74.44%和74.23%。如表2所示,生猪肉的蛋白质含量最高(22.08%),其次是生鸡肉(20.55%)及生牛肉(18.46%),蛋白质含量最低的是生草鱼(16.89%)。Gibis^[25]等人对生牛肉、猪肉、鸡肉水分含量及蛋白质含量进行了研究,结果显示,水分含量和蛋白质含量分别是73.5%、72.6%、74.2%

和23.2%、24.1%、24.0%,水分含量均低于本研究结果,而蛋白质含量刚好相反,均高于本研究结果。这一现象可能是由于购买原材料的路径不一致所导致的。如表3所示,天冬氨酸、脯氨酸、甘氨酸、半胱氨酸、组氨酸和赖氨酸除外,其它氨基酸含量的排序如下:生猪肉>生鸡肉>生牛肉>生草鱼。用6 mol/L 盐酸对生肉样本进行酸水解会破坏色氨酸,并将谷氨酰胺和天冬酰胺分别转化为谷氨酸和天冬氨酸,这可能是生肉样中未检出色氨酸及检出谷氨酸和天冬氨酸含量相对更高的原因。

表2 生牛肉,草鱼,猪肉,鸡肉的水分和蛋白质含量

Table 2 Moisture, protein content of raw beef, grass carp, pork and chicken

肉的种类	水分含量/%	蛋白质含量/%
牛肉	75.50±0.00 ^b	18.46±0.29 ^b
草鱼	78.14±0.01 ^c	16.89±0.47 ^a
猪肉	74.44±0.00 ^a	22.08±0.07 ^d
鸡肉	74.23±0.00 ^a	20.55±0.23 ^c

注:数值表示为平均值±标准差(n=3),同列数据上标不同字母表示差异显著($p<0.05$)。

表3 生牛肉,草鱼,猪肉,鸡肉的氨基酸含量

Table 3 Amino acids (AAs) content in raw beef, grass carp, pork and chicken

氨基酸种类	牛肉/(×10 ⁷ ng/g)	草鱼/(×10 ⁷ ng/g)	猪肉/(×10 ⁷ ng/g)	鸡肉/(×10 ⁷ ng/g)
天冬氨酸	2.05	2.12	2.59	2.42
苏氨酸	0.97	0.90	1.26	1.15
丝氨酸	1.02	1.01	1.28	1.20
谷氨酸	2.94	2.71	3.72	3.44
脯氨酸	0.80	0.69	0.81	0.74
甘氨酸	1.47	1.67	1.41	1.33
丙氨酸	1.59	1.57	1.81	1.74
半胱氨酸	0.06	0.08	0.12	0.13
缬氨酸	0.95	0.87	1.15	1.09
蛋氨酸	0.38	0.38	0.50	0.47
异亮氨酸	0.72	0.67	0.93	0.89
亮氨酸	1.29	1.19	1.58	1.46
酪氨酸	0.18	0.16	0.21	0.19
苯丙氨酸	0.66	0.62	0.77	0.70
组氨酸	0.54	0.37	0.77	0.53
赖氨酸	1.67	1.67	2.13	1.97
精氨酸	1.37	1.23	1.68	1.64

注:数值表示为平均值(n=2)。

2.2 HAAs 的检出限及定量限

表4列出了六种HAAs的标准线性方程式,线性相关系数(r^2),检出限和定量限。HAAs的检出限和

定量限分别通过信噪比3(S/N=3)和10(S/N=10)估算。目前对于肉制品中HAAs的检测较多集中于使用灵敏度高的HPLC-MS/MS。现有研究对于HAAs的检测限范围在0.0100~1.0000 ng/g,PhIP最低定量限

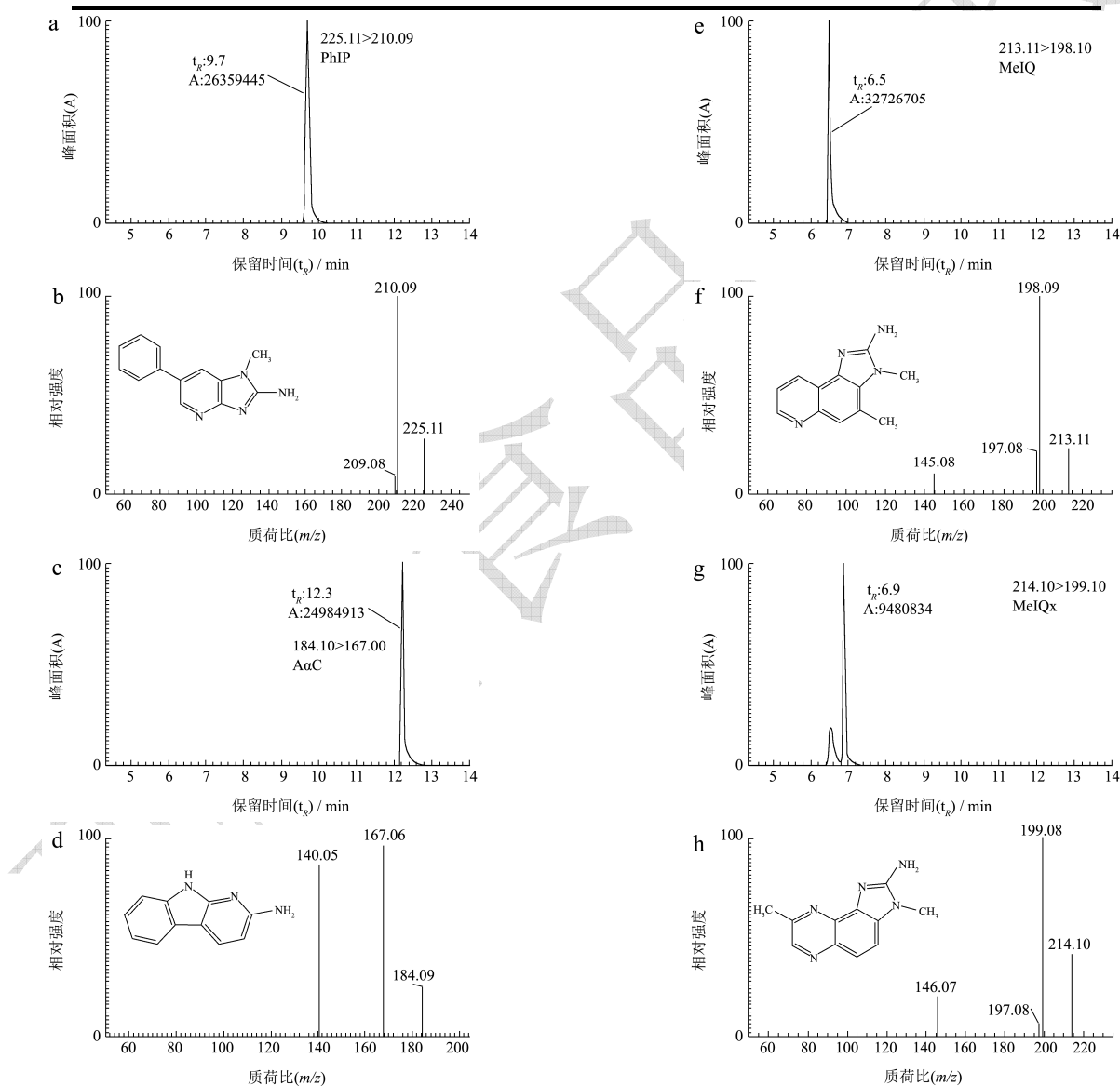
为 0.3620 ng/g^[3]。本研究通过优化 HAAs 的富集提纯及检测条件,对于肉样中六种 HAAs 的检测限均有较大程度的降低,最低检测限低至 0.0006~0.0010 ng/g,

PhIP 定量限低至 0.0021 ng/g,检测灵敏度更高。六种 HAAs 标准品的提取离子流图和相应 HAA 的二级质谱图见图 1。

表 4 6 种杂环胺的标准线性方程式,线性相关系数,检出限,定量限

Table 4 Calibration curve equation, r^2 , LOD, and LOQ values for six analyzed HAAs

杂环胺种类	标准线性方程式	线性相关系数	检出限/(ng/g)	定量限/(ng/g)
PhIP	$y=212027x-3000000$	0.9995	0.0006	0.0021
AaC	$y=172852x-2000000$	0.9998	0.0008	0.0027
MeIQ	$y=153098x+347610$	0.9999	0.0010	0.0032
MeIQx	$y=90028x+837766$	0.9975	0.0006	0.0021
4,8-DiMeIQx	$y=100629x+450898$	0.9997	0.0010	0.0032
7,8-DiMeIQx	$y=68708x+450655$	0.9986	0.0009	0.0031



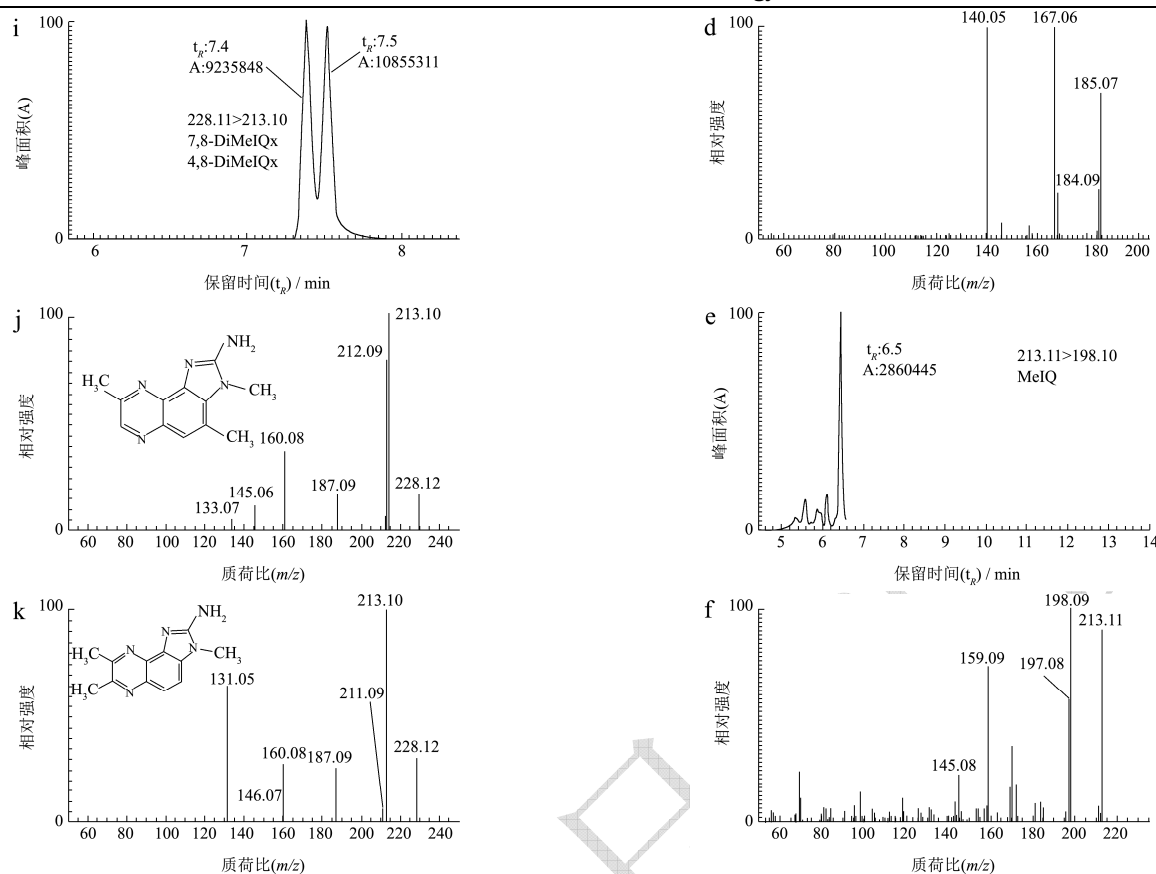
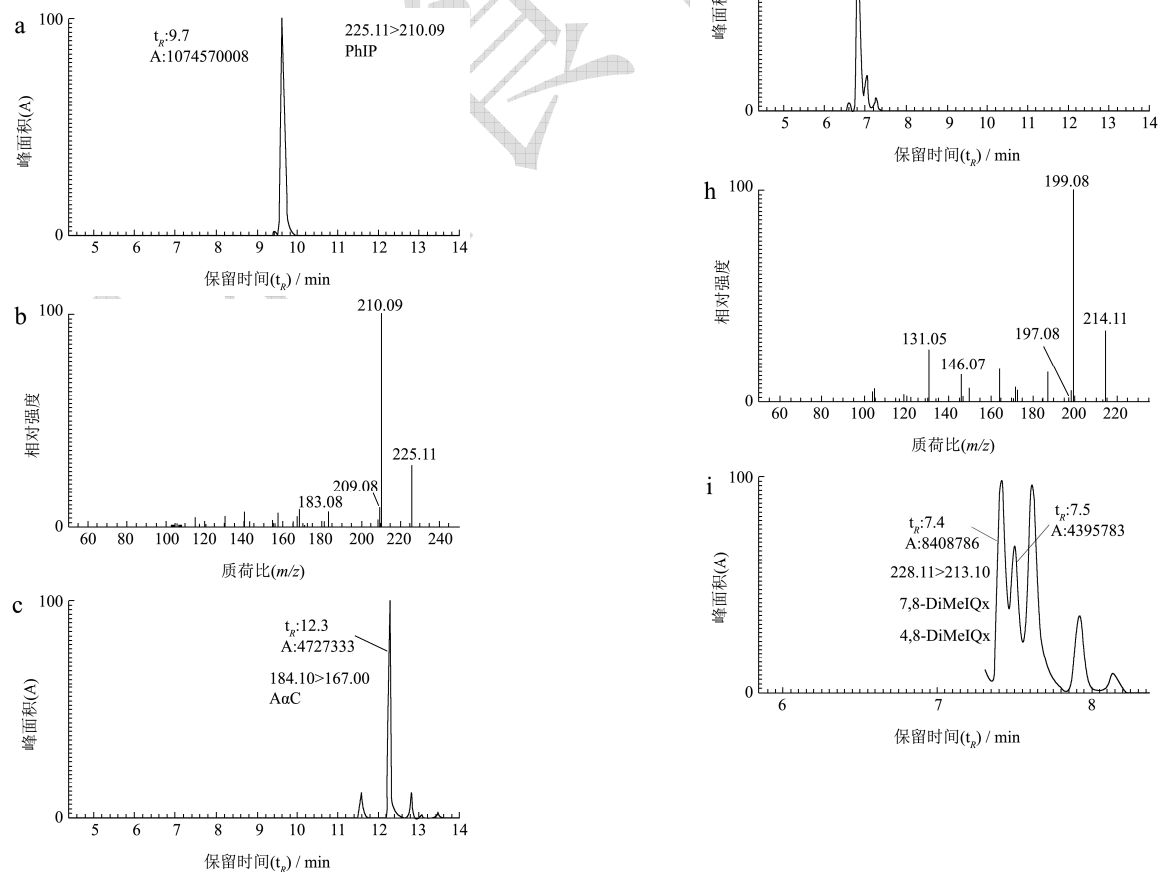


图1 6种HAAs的提取离子流图和相应HAA的二级质谱图

Fig.1 Reconstructed ion chromatograms of six HAAs and corresponding product ion mass spectra.



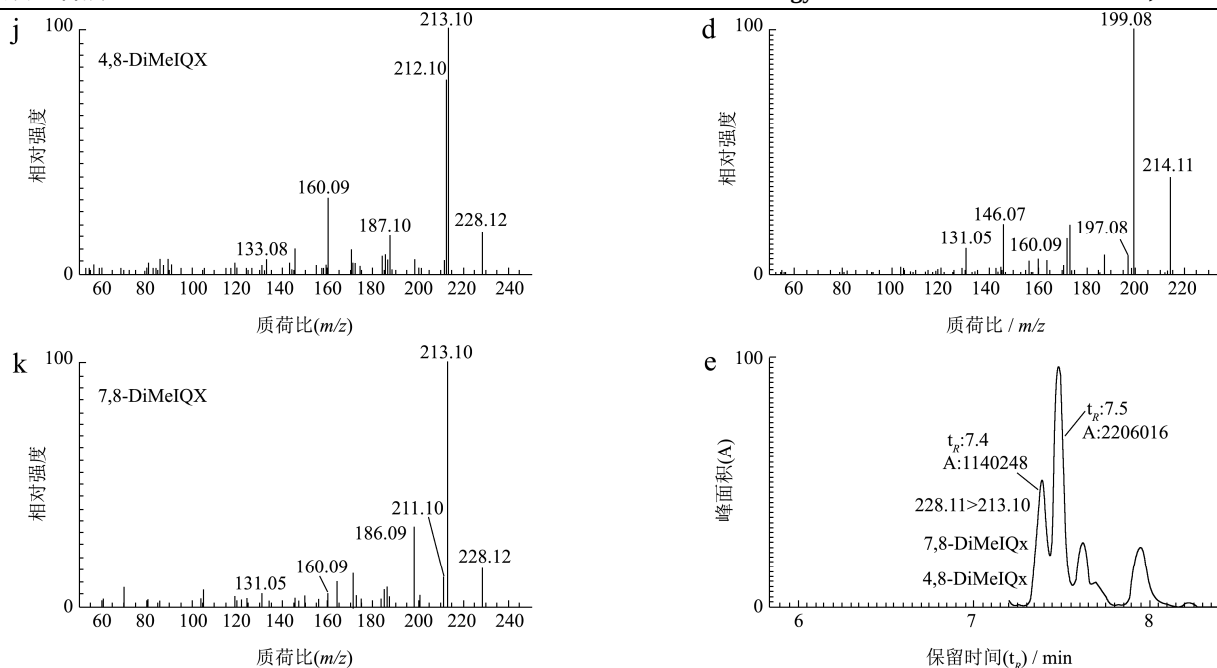


图2 烘烤猪肉(275 °C烹制)中HAA的提取离子流图和相应HAA的二级质谱图

Fig.2 Reconstructed ion chromatograms of HAAs in the roasted pork cooked at 275 °C and corresponding product ion mass spectra.

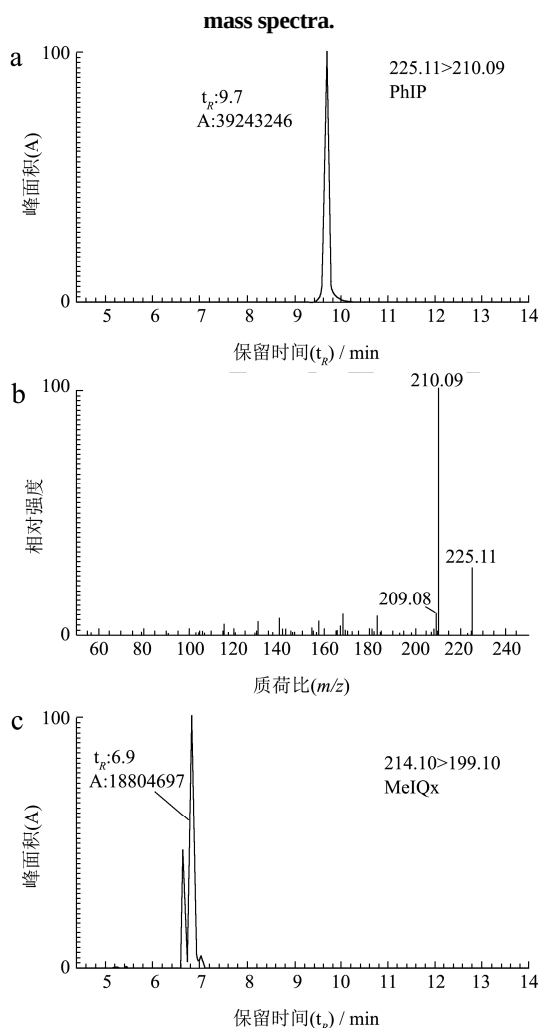


图3 油炸牛肉(200 °C烹制)中HAA的提取离子流图和相应HAA的二级质谱图

Fig.3 Reconstructed ion chromatograms of HAAs in the deep-fried beef cooked at 200 °C and corresponding product ion mass spectra

在优化的色谱质谱条件下,六种HAA在14 min基本分离。其中4,8-DiMeIQx与7,8-DiMeIQx为同分异构体,性质相近,二级质谱图差异小,较难分离。两物质的分离度 $R > 0.85$,出峰有一定重叠,但两物质的峰形都比较好,定量虽有一些误差,不过对样品中两种HAA的评估影响不大。考虑到分析时间和设备条件,本实验没有进一步对色谱条件进行优化。实验样品中HAA的提取离子流图和相应HAA的二级

质谱图如图2和图3所示。

2.3 不同加工方式下不同种类肉中 HAAs 含量

烘烤与油炸肉样中形成的六种 HAAs 的含量分别见表5和表6。由数据可知,随着温度的升高,HAAs 水平显著增加,这与早期关于 HAAs 含量随温度变化的发现相吻合^[5]。AaC 和 MeIQ 在油炸样品中均未检出,在 225 °C 加工的烘烤样品中也基本未检出。12 个烘烤样品中有 9 个样品检测到 AaC,最高含量为 1.92 ng/g,来自于 275 °C 下烹制的烤猪肉。与生牛肉、鸡肉和鱼类相比,生猪肉中谷氨酸的含量最高,这可能也是导致猪肉中形成非 IQ 型 HAAs-AaC 含量相对较高的原因。250 °C 高温加工的烤牛肉,草鱼,猪肉和鸡肉中形成的 AaC 含量相当低,范围为 0.26~0.30 ng/g,这可能是由于 AaC 属于非 IQ 型 HAAs,需要更高加工温度(>250 °C)才能形成。MeIQ 仅在 250 °C 和 275 °C 加工温度下烘烤的样品中检出,浓度最高为 0.97 ng/g。在 275 °C 高温加工条件下,烤猪肉中形成较其他烘烤肉类更多的 MeIQ。相关研究显示,高温加工的牛肉,鱼肉,猪肉或鸡肉中 MeIQ 含量低或低于检测限^[13-16]。这说明 MeIQ 不易在高温加工牛肉,鱼肉,猪肉或鸡肉的过程中产生。

12 个烘烤烹制的样本中有 10 个样本检测出 4,8-DiMeIQx 和 7,8-DiMeIQx,最高含量分别为 4.59 ng/g 和 6.54 ng/g。其中 225 °C 下烹制的烤牛肉和烤鱼中未检出 4,8-DiMeIQx 和 7,8-DiMeIQx。4,8-DiMeIQx 和 7,8-DiMeIQx 在 160 °C 加工条件下的油炸样品中均未检出。200 °C 加工的油炸牛肉中 4,8-DiMeIQx 和 7,8-DiMeIQx 含量分别是 0.99 ng/g 和 0.70 ng/g。Oz 等人^[17]在 200 °C 加工条件下的煎牛肉中检测出 0.01 ng/g 的 7,8-DiMeIQx,但没有检测到 4,8-DiMeIQx。这表明加工方式对于 4,8-DiMeIQx 和 7,8-DiMeIQx 的生成有较大影响。与其他 HAAs 相比,关于肉制品中 7,8-DiMeIQx 的研究相对较少。

PhIP 和 MeIQx 是肉制品中含量最丰富的两种 HAAs。在本研究中,所有样品中 PhIP 的含量均处于相对较高水平。275 °C 高温加工的烤鸡肉中 PhIP 的含量最高(高达 341.15 ng/g)。Sinha 等人^[18]研究了不同加工方式对鸡胸肉中 PhIP 含量的影响及不同熟度鸡胸肉中 PhIP 的水平差异,研究发现在表层加热温度为 260 °C 下完全烧焦的无皮鸡胸肉中 PhIP 含量是 480 ng/g。本研究结果与该结果相似,可能与研究部位均为无皮鸡胸部及肉的熟度相近有关。225 °C 高温加工的烤猪肉中 PhIP 含量为 1.27 ng/g,相比之下,275 °C

高温加工的烤猪肉中生成的 PhIP 量(195.80 ng/g)增加了近 154 倍。表明烹饪温度对 PhIP 的生成影响极其显著。同时,在所有样品中均检出了 MeIQx,含量范围为 0.30~10.82 ng/g。数据显示干燥的环境(烘烤)更有利于 PhIP 的生成,而 MeIQx 好像更易在潮湿的环境(油炸)中生成。

实验使用烹饪温度是根据中国普通家庭的烹饪习惯而定。而不同烹饪方法所需烹饪时间(烘烤 15 min,油炸 3 min)的选择是在确保加工后肉和鱼制品能达到正常食用标准的基础上确定的。为了尽量减少其他因素的影响,除食盐外,不添加其他调味品。实验结果显示(表5~6),在相近加工温度下,油炸(200 °C)烹制肉类和鱼所产生的 HAAs 量要高于烘烤(225 °C)。导致这一结果的原因可能是:一,烘烤过程中烤箱里的水蒸气使样品表面实际温度低于加工温度;二,烘烤属于间接加热方式(空气传热),而油炸则是直接接触热源,油炸实际加热温度可能会更高^[19]。因此相对于油炸,烘烤加工肉和鱼时可设置相对较高的温度和较长烹饪时间。在实验使用最高加工温度(275 °C)下烹制的肉样中六种 HAAs 的含量均为最高,这表明加热温度是 HAAs 形成的关键因素。Persson 等人^[20]研究报道中指出,由于氯化钠提高了肉类的持水能力,因此在肉类中添加氯化钠可以显著减少 PhIP 的形成。与该结果相反,在本研究中得出,在相近加工温度下,烘烤样品(不含食盐)生成的 PhIP 低于油炸样品(含食盐)中形成的 PhIP,这表明烹饪方法对于杂环胺生成的影响要远胜于食盐。

除此之外,数据显示肉及鱼的种类对于不同的 HAAs 的生成有着显著影响。在同样的烘烤温度(275 °C)下,烘烤烹制的鸡肉中 HAAs 总量最高,其次是烤猪肉,草鱼和牛肉。这可能是因为鸡肉的水分相较于其他三种肉最低,同时其蛋白质含量仅次于猪肉。同时烘烤的加工过程中,MeIQx 和 7,8-DiMeIQx 的生成量与不同种类肉的蛋白质含量存在一定的相关性。油炸样品中 HAAs 总含量大致趋势如下:牛肉>猪肉>鸡肉>草鱼。这一结果表明,红肉(牛肉、猪肉)在油炸加工条件下相较于白肉(鸡肉、草鱼)更易于 HAAs 的生成。Lu 等人^[21]的研究结果显示油炸温度为 180 °C 时,鸡肉中的 HAAs 生成量比牛肉少。该研究结果与本实验一致。在本研究中,草鱼的水分含量最高,蛋白质含量最低,可能是 HAAs 水平最低的原因。在加热肉和鱼过程中,水充当温度调节剂和反应介质。加热过程中,随着水蒸气的产生,水分含量增加,导致表面温度降低,从而 HAAs 的生成量更低^[22]。

表 5 225 °C, 250 °C, 275 °C 下烘烤制备的牛肉, 草鱼, 猪肉和鸡肉的杂环胺含量 (ng/g)

Table 5 Heterocyclic aromatic amines levels (ng/g) of roasted beef, grass carp, pork and chicken at 225 °C, 250 °C, 275 °C

杂环胺种类	加工温度/°C	肉制品种类			
		牛肉	草鱼	猪肉	鸡肉
PhIP	225	0.32±0.01 ^a	0.31±0.00 ^a	1.27±0.26 ^b	2.42±0.42 ^c
	250	4.44±0.31 ^b	1.68±0.02 ^a	18.44±0.90 ^c	50.49±1.04 ^d
	275	6.74±0.33 ^a	21.72±0.36 ^b	195.80±18.48 ^c	341.15±7.87 ^d
AαC	225	0.28±0.06 ^a	ND	ND	ND
	250	0.30±0.08 ^a	0.29±0.04 ^a	0.28±0.02 ^a	0.26±0.01 ^a
	275	0.50±0.01 ^a	0.48±0.02 ^a	1.92±0.26 ^b	0.58±0.01 ^a
MeIQ	225	ND	ND	ND	ND
	250	0.32±0.01 ^a	0.32±0.01 ^a	0.31±0.00 ^a	0.31±0.00 ^a
	275	0.33±0.01 ^a	0.48±0.03 ^b	0.97±0.06 ^c	0.58±0.10 ^b
MeIQx	225	0.35±0.01 ^a	0.30±0.00 ^a	1.40±0.40 ^b	1.11±0.15 ^b
	250	3.46±0.31 ^b	0.37±0.05 ^a	4.98±0.18 ^c	3.84±0.37 ^b
	275	4.22±0.76 ^b	0.72±0.19 ^a	10.82±0.23 ^c	4.31±0.77 ^b
4,8-DiMeIQx	225	ND	ND	0.49±0.03 ^a	0.57±0.04 ^b
	250	1.17±0.19 ^b	0.31±0.01 ^a	1.76±0.03 ^c	1.88±0.07 ^c
	275	1.37±0.13 ^a	1.06±0.26 ^a	3.38±0.12 ^b	4.59±0.29 ^c
7,8-DiMeIQx	225	ND	ND	0.41±0.03 ^b	0.35±0.01 ^a
	250	0.89±0.09 ^b	0.29±0.00 ^a	1.24±0.01 ^c	0.90±0.10 ^b
	275	0.94±0.06 ^{ab}	0.42±0.02 ^a	6.54±0.95 ^c	1.63±0.00 ^b

注: “ND”: 未检出; 数值表示为平均值±标准差(n=3); 同行数据上标不同字母者表示差异显著($p<0.05$);下同。

表 6 160 °C, 180 °C, 200 °C 下油炸制备的牛肉, 草鱼, 猪肉和鸡肉的杂环胺含量 (ng/g)

Table 6 Heterocyclic aromatic amines levels (ng/g) of fried beef, grass carp, pork and chicken at 160 °C, 180 °C, 200 °C

杂环胺种类	加工温度/°C	肉制品种类			
		牛肉	草鱼	猪肉	鸡肉
PhIP	160	0.53±0.03 ^b	0.38±0.01 ^a	0.38±0.01 ^a	0.35±0.01 ^a
	180	1.30±0.20 ^c	0.55±0.02 ^a	0.65±0.06 ^{ab}	0.80±0.08 ^b
	200	6.45±0.66 ^c	1.33±0.09 ^a	6.93±0.10 ^c	4.77±0.42 ^b
AαC	160	ND	ND	ND	ND
	180	ND	ND	ND	ND
	200	ND	ND	ND	ND
MeIQ	160	ND	ND	ND	ND
	180	ND	ND	ND	ND
	200	ND	ND	ND	ND
MeIQx	160	0.92±0.07 ^c	0.38±0.01 ^a	0.57±0.02 ^b	0.38±0.01 ^a
	180	1.87±0.30 ^c	0.50±0.04 ^a	1.01±0.12 ^b	1.31±0.04 ^b
	200	7.44±0.51 ^d	0.87±0.07 ^a	5.81±0.22 ^c	3.34±0.38 ^b
4,8-DiMeIQx	160	ND	ND	ND	ND
	180	0.44±0.04 ^b	0.32±0.00 ^a	0.34±0.01 ^a	0.35±0.01 ^a
	200	0.99±0.08 ^c	0.40±0.01 ^a	0.95±0.02 ^c	0.57±0.03 ^b
7,8-DiMeIQx	160	ND	ND	ND	ND
	180	0.35±0.02 ^b	0.30±0.00 ^a	0.30±0.00 ^a	0.31±0.00 ^a
	200	0.70±0.06 ^b	0.35±0.01 ^a	0.68±0.06 ^b	0.39±0.01 ^a

根据模拟模型,氨基酸被认为是 HAAs 的前体物质之一。苯丙氨酸,酪氨酸和异亮氨酸均对 PhIP 的形成有促进作用^[19]。苏氨酸,甘氨酸,赖氨酸,丙氨酸和丝氨酸含量与 MeIQx 含量增加显著相关^[23]。4,8-DiMeIQx 前体物可能是苏氨酸,丙氨酸和赖氨酸^[24]。7,8-DiMeIQx 的形成主要归功于甘氨酸,丙氨酸和赖氨酸^[5]。许多研究报告提出了肉中的游离氨基酸与 HAAs 的产生量之间存在正相关性,但也有些研究表明两者并没有直接相关性^[25,26]。有研究表明牛肉中游离天冬氨酸,甘氨酸,谷氨酸,色氨酸,苯丙氨酸,赖氨酸和酪氨酸与烤制过程中 HAAs 的生成量呈正相关^[4]。Cheng^[27]认为,红烧鸡肉中的游离氨基酸与 IQ, MeIQ 和 MeIQx 的形成之间没有正相关性,且苯丙氨酸与 PhIP 的形成之间没有联系。考虑到除游离氨基酸外,蛋白质及多肽中的相关氨基酸也可能参与 HAAs 的生成,本研究对不同肉样中的氨基酸含量进行了检测(表 3)。除甘氨酸和半胱氨酸外,生猪肉中其他氨基酸含量均最高。但是,对于同样的原料肉进行烘烤和油炸加工的过程中,不同 HAAs 产生的趋势存在显著差异,这说明在不同加工过程中 HAAs 的生成途径和方式可能存在差异。由于 HAAs 的生成量受加工过程中诸多因素影响,因此探索 HAAs 含量与不同肉类中的前体物质之间的关系仍是一项极大的挑战。

3 结论

现有研究中,评估 HAAs 生成量的焦点主要集中在加工方法和肉的种类。本文使用液液萃取和固相萃取,结合 HPLC-MS/MS 方法研究了烘烤与油炸两种方式加工牛肉、草鱼、猪肉和鸡肉所产生的 HAAs。该方法具有准确性好、灵敏度高、检出限及定量限低等优点。研究结果表明,HAAs 的形成与烹饪方法和烹饪温度具有极高相关性。在相近的加工温度下,油炸方式所产生的杂环胺高于烘烤。肉的种类对 HAAs 的形成具有显著差异化影响,不同的加工方式及不同的加工温度所产生的结果也不同。近年来,肉类消费量持续升高,而烤肉和油炸食品一直深受大众欢迎。对肉制品中致癌物的研究将受到愈来愈多的关注。我们的目的是评估 HAAs 在不同肉制品中的生成量,并帮助人们找到有益于健康的烹饪加工方式,以减少致癌物的摄入。且可能有助于更加真实评估 HAAs 对于人体健康的危害。

参考文献

[1] Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, et al.

Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish [J]. *Cancer Science*, 2004, 95(4): 290-299

[2] Wolk A. Potential health hazards of eating red meat [J]. *Journal of Internal Medicine*, 2017, 281(2): 106-122

[3] Barzegar F, Kamankesh M, Mohammadi A. Heterocyclic aromatic amines in cooked food: a review on formation, health risk-toxicology and their analytical techniques [J]. *Food Chemistry*, 2019, 280: 240-254

[4] Sztark A. Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: the influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2015, 40: 39-46

[5] Gibis M. Heterocyclic aromatic amines in cooked meat products: causes, formation, occurrence, and risk assessment [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, 15(2): 269-302

[6] Zhang W, Naveena B M, Jo C, et al. Technological demands of meat processing-an Asian perspective [J]. *Meat Science*, 2017, 132: 35-44

[7] Gross G, Grüter A, Heyland S. Optimization of the sensitivity of high-performance liquid chromatography in the detection of heterocyclic aromatic amine mutagens [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1992, 30(6): 491-498

[8] Messner C, Murkovic M. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines [J]. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2004, 802(1): 19-26

[9] Turesky R J, Jason T, Laura S, et al. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(8): 3248-3258

[10] GB 5009.3-2016,食品中水分的测定[S]
GB 5009.3-2016, National Food Safety Standard Determination of Moisture in Foods [S]

[11] GB 5009.5-2016,食品中蛋白质的测定[S]
GB 5009.5-2016, National Food Safety Standard Determination of Protein in Foods [S]

[12] GB 5009.124-2016,食品中氨基酸的测定[S]
GB 5009.124-2016, National Food Safety Standard Determination of Amino Acids in Foods [S]

[13] Oz F, Kaban G, Kaya M. Heterocyclic aromatic amine contents of beef and lamb chops cooked by different methods to varying levels [J]. *Journal of Animal and Veterinary*

- Advances, 2010, 9(10): 1436-1440
- [14] Oz F, Kaban G, Kaya M. Effects of cooking techniques and levels on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish [J]. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2010, 9(8): 1259-1264
- [15] Skog K, Augustsson K, Steineck G, et al. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues [J]. Food and Chemical Toxicology, 1997, 35(6): 555-565
- [16] Warzecha L, Janoszka B, Błaszczyk U, et al. Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes [J]. Journal of Chromatography B, 2004, 802(1): 95-106
- [17] Oz F, Kizil M, Cakmak I, et al. The effect of direct addition of conjugated linoleic acid on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chops [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2015, 39(6): 2820-2833
- [18] Sinha R, Rothman N, Brown E D, et al. 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 [J]. Cancer Research, 1995, 55(20): 4516-4519
- [19] Skog K I, Johansson M A E, Jagerstad M I. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake [J]. Food and Chemical Toxicology, 1998, 36(9-10): 879-896
- [20] Persson E, Sjöholm I, Skog K. Effect of high water-holding capacity on the formation of heterocyclic amines in fried beef burgers [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(15): 4472-4477
- [21] Lu F, Kuhnle G K, Cheng Q. The effect of common spices and meat type on the formation of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in deep-fried meatballs [J]. Food Control, 2018, 92: 399-411
- [22] Persson E, Sjöholm I, Nyman M, et al. Addition of various carbohydrates to beef burgers affects the formation of heterocyclic amines during frying [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(25): 7561-7566
- [23] Jägerstad M, Skog K, Grivas S, et al. Formation of heterocyclic amines using model systems [J]. Mutation Research, 1991, 259(3-4): 219-233
- [24] Johansson M A, Fay L B, Gross G A, et al. Influence of amino acids on the formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in a model system [J]. Carcinogenesis, 1995, 16(10): 2553-2560
- [25] Gibis M, Weiss J. Impact of precursors creatine, creatinine, and glucose on the formation of heterocyclic aromatic amines in grilled patties of various animal species [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(11): 2430-2439
- [26] Sztark A, Waszkiewicz-Robak B. Influence of selected quality factors of beef on the profile and the quantity of heterocyclic aromatic amines during processing at high temperature [J]. Meat Science, 2014, 96(3): 1177-1184
- [27] Cheng Y, Yao M, Zhu Z, et al. Content, causes and analysis of heterocyclic amines in chinese traditional braised chicken [J]. Food Additives and Contaminants: Part A, 2019, 36(7): 1032-1041

(上接第 165 页)

- [16] GB 5009.181-2016, 食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定[S]
GB 5009.181-2016, National Food Safety Standard-Determination of Malondialdehyde in Food [S]
- [17] 李阳,汪超,廖李,等.低剂量辐照和 Vc 对鸡肉冷藏品质的影响[J].现代食品科技,2014,30(7),211-217
LI Yang, WANG Chao, LIAO Li, et al. Effects of low-dose irradiation and Vc content on the storage quality of refrigerated chicken [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 211-217
- [18] Iulia Movileanu, Máryuri T Núñez de González, Brian Hafley, et al. Comparison of dried plum puree, rosemary extract, and BHA/BHT as antioxidants in irradiated ground beef patties [J]. International Journal of Food Science, 2013, 2013: 1-7
- [19] 姜秀杰,李淑荣,张东杰,等.辐照调理鸡肉天然抗氧化剂配比优化研究[J].食品科技,2011,36(7):120-124
JIANG Xiu-jie, LI Shu-rong, ZHANG Dong-jie, et al. Ratio optimize research of the natural the antioxidants in irradiated pre-processed chicken [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(7): 120-124
- [20] NY/T 2073-2011, 调理肉制品加工技术规范[S]
NY/T 2073-2011, Technical Regulation for Processing of Prepared Meat Products [S]