



引用格式:白艳红,韩雪,李可,等.市售酱卤鸡腿老汤中杂环胺含量的检测与分析[J].轻工学报,2017,32(3):8-13.

中图分类号:TS251.6<sup>+</sup>1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2017.3.002

文章编号:2096-1553(2017)03-0008-06

# 市售酱卤鸡腿老汤中杂环胺含量的检测与分析

## Detection and analysis of heterocyclic aromatic amines in halogen soups of market-derived stewed chicken legs

白艳红,韩雪,李可,栗俊广,谢美娟,赵电波,张华

BAI Yan-hong, HAN Xue, LI Ke, LI Jun-guang, XIE Mei-Juan, ZHAO Dian-bo, ZHANG Hua

郑州轻工业学院 食品与生物工程学院/食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南 郑州 450001

*College of Food and Bioengineering/He'nan Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China*

### 关键词:

酱卤鸡腿老汤;杂环胺;超高效液相色谱串联质谱

### Key words:

halogen soups of stewed chicken leg; heterocyclic aromatic amines; UPLC-MS/MS

**摘要:**采用超高效液相色谱串联质谱法、分两个批次对随机抽取的农贸市场3家个人摊点酱卤鸡腿老汤中10种杂环胺含量进行检测与分析.结果表明,酱卤鸡腿老汤中杂环胺总含量最高可达35.626 ng/g,共检出8种杂环胺,其中Harman和Norharman在3家老汤中均被检出,其含量占杂环胺总含量的41%~77%.鉴于此,建议生产方严格控制卤煮工艺,减少老汤使用次数.

收稿日期:2017-02-17

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD040040304);河南省高校科技创新人才支持计划项目(15HASTIT033);郑州轻工业学院博士启动科研基金项目(2015BSJJ038);食品生产与安全河南省协同创新中心研究生科技创新基金项目(FCICY201615,FCICY201618)

作者简介:白艳红(1975—),女,辽宁省彰武县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为畜产品加工与质量控制.

**Abstract:** Aimed to evaluate the contents of 10 heterocyclic aromatic amines (HAs) in two batches of halogen soups of stewed chicken legs randomly selected from three individual market stalls by using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The results showed that the total contents of detected 8 HAs in halogen soups of stewed chicken legs from three individual market stalls reached 35.626 ng/g. In that, both Harman and Norharman accounted for 41% ~77% of the total HAs. Thus, it was imperative to recommend the producers to strictly control the stewing process and reduce the recycle numbers of halogen soups.

## 0 引言

酱卤鸡肉制品是我国特有的传统肉制品之一。千百年来,我国不同地区根据各地饮食习惯形成了独具地方特色的传统酱卤制品,深受广大消费者喜爱。酱卤肉制品是在水中加入食盐、酱油等调味料和香辛料,经煮制而成的熟肉制品<sup>[1]</sup>,其主要特点是老汤在卤煮过程中赋予产品以鲜艳的色泽、独特的风味和良好的口感。老汤是指经过多次(一般认为至少15次)反复煮制的卤水,生产时常被反复使用。但由于长时间高温卤煮加工,且生产者对酱卤关键技术的掌控程度不够,老汤中很可能会产生杂环胺,使得酱卤肉制品存在一定的安全隐患。

流行病学研究表明,直肠癌、胃肠道癌和前列腺癌等疾病与过量食用经高温或长时间熟制的肉制品中含有的杂环胺有一定的关系。因此,肉制品加工过程中杂环胺的生成逐渐成为肉品加工与质量控制的研究热点。目前,国外研究主要集中在油炸和烤制工艺对肉制品中杂环胺生成的影响<sup>[2-5]</sup>,国内则主要研究传统肉制品中杂环胺的含量,且多集中于禽肉和牛肉制品<sup>[6-7]</sup>。相关研究表明,肉制品中检测出含量最多的是 Harman 和 Norharman 两种杂环胺,并且在低温和高温条件下均易生成<sup>[8-9]</sup>,而关于老汤中杂环胺的种类和含量研究尚缺乏相关报道。鉴于此,本文拟采用超高效液相色谱串联质谱方法(UPLC-MS/MS)对市售酱卤鸡腿老汤中的杂环胺含量进行抽样检测,分析酱卤老汤中杂环胺的组成特点,旨在了解市售酱卤鸡腿的

安全性,给消费者安全食用提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

**样品采集:** 酱卤鸡腿老汤,采集于河南省郑州市某农贸市场,随机选择3家摊点(编号A, B, C),分两批进行采集(第一批和第二批相差1个月)。每家摊点每一批次分别在4个不同时间点各采集50 mL老汤,混合均匀(200 mL)。随后在无菌操作台上平均分装成5份,分别储存在60 mL带盖磨口瓶内。3家摊点、两个批次样品共计30瓶,于-18℃下贮存待测。

**试剂:** 10种杂环胺标准品,分别为 Harman(1-甲基-9H-吡啶并[3,4-b]吡啶)、Norharman(9H-吡啶并[3,4-b]吡啶)、PhIP(2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶)、Trp-P-1(3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶)、Trp-P-2(3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶)、IQ(2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹啉)、MeIQx(2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉)、4,8-DiMeIQx(2-氨基-3,4,8-三甲基咪唑并[4,5-f]喹啉)、AαC(2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole 2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶)、MeAαC(2-氨基-3-甲基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶),纯度均大于96%,购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司;硅藻土,购自天津市科密欧化学试剂有限公司;Oasis MCX 混合阳离子交换小柱(3 mL/60 mg),购自美国 Waters 公司;乙酸乙酯、甲

醇、乙腈、甲酸、冰醋酸,均为色谱纯,购自北京 DIKMA 公司;其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(配备 Thermo LTQ XL 质谱检测器),美国 Agilent 公司产;12 管固相萃取装置,日本岛津公司产;N150-2 氮吹仪,上海博翔仪器设备公司产;YQD-09 氮气减压装置,青岛华青仪表有限公司产;SB-4200-DT 超声波清洗机,宁波新芝生物科技有限公司产;AB265-S 电子天平,瑞士梅特勒公司产;JA3003N 型电子天平,上海菁海仪器设备有限公司产;Milli-Q 超纯水器,美国 Millipore 公司产;HC-3618 高速冷冻离心机,安徽中科中佳仪器有限公司产。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 杂环胺的提取

参照文献[10]杂环胺提取方法,稍作修改。准确称取 3.0 g 卤汤,将其加入 30 mL 1 mol/L NaOH 溶液中,磁力搅拌 1 min,加入 15 g 硅藻土,混合均匀。然后用 30 mL 乙酸乙酯超声波提取 50 min,重复提取两次,置于 78.5 N 离心力下离心 10 min,合并上清液。上样前预先用 5 mL 甲醇活化混合阳离子交换小柱,待样品全部通过固相萃取小柱后,分别用 3 mL 乙酸乙酯、6 mL 0.1 mol/L HCl 淋洗,流速控制在 1.0~1.5 mL/min,抽干。最后用 6 mL 甲醇/氨水( $V(\text{甲醇}):V(\text{氨水})=19:1$ )洗脱。洗脱液经氮吹仪在 50 °C 条件下吹干后,用 500  $\mu\text{L}$  甲醇复溶,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,对滤液进行 UPLC-MS/MS 分析。

### 1.3.2 UPLC-MS/MS 检测条件

Agilent EclipsePlusC18 色谱柱(2.1 mm  $\times$  150 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ),柱温 30 °C,流动相 A 为 25 mmol/L 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈。

梯度洗脱程序:0~18 min,B 由 10% 上升至 30%;18~20 min,B 由 30% 上升至 100%,保持 3 min;23~25 min,B 由 100% 下降至 10%,保持 1 min。进样量为 5  $\mu\text{L}$ ,流速为 0.3 mL/min。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;检测方式为多反应监测(SRM)扫描模式;离子喷雾电压为 3.5 kV,毛细管温度为 300 °C,毛细管电压为 12 V,鞘气体( $\text{N}_2$ )流速为 30 arb,辅助气体( $\text{N}_2$ )流速为 5 arb。

### 1.4 样品中杂环胺含量的计算

试样中杂环胺的测定值  $\omega/(\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})$  计算公式为

$$\omega = \frac{C_0 \times V \times A}{mA_0}$$

式中, $C_0$  表示标准溶液的质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ , $V$  表示试样定容体积/L, $A$  表示样品溶液峰面积, $m$  表示所取老汤样品的质量/g, $A_0$  表示标准溶液峰面积。

## 1.5 数据处理

用 SPSS 16.0 进行数据统计分析,采用单因素方差分析和 Dunnett 法多重比较进行统计学差异检验,统计结果表示为  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ,显著性水平  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 10 种杂环胺的提取离子流色谱图

由于 10 种杂环胺化合物化学特性差异性较大,采用等度洗脱难以在短时间内实现分离,故采取梯度洗脱。根据杂环胺的结构特性,选择正离子模式,在电喷雾条件下对浓度为 200 ng/mL 的单标准品进行二级质谱分析,得到各自碎片离子。每种化合物选择两个信号最强的特征碎片离子作为子离子,根据子离子和母离子确定色谱峰,10 种杂环胺提取离子流色谱图如图 1 所示。

由图 1 可知,10 种杂环胺化合物峰型均很尖锐,根据保留时间和  $m/z$  能够确定杂环胺化合物的色谱图,以满足阳性样品中杂环胺的定性、定量分析。

### 2.2 老汤样品中 10 种杂环胺含量的分析

3 家市售酱卤鸡腿不同批次的老汤样品中的杂环胺测定结果见表 1。由表 1 可知,在 3 家

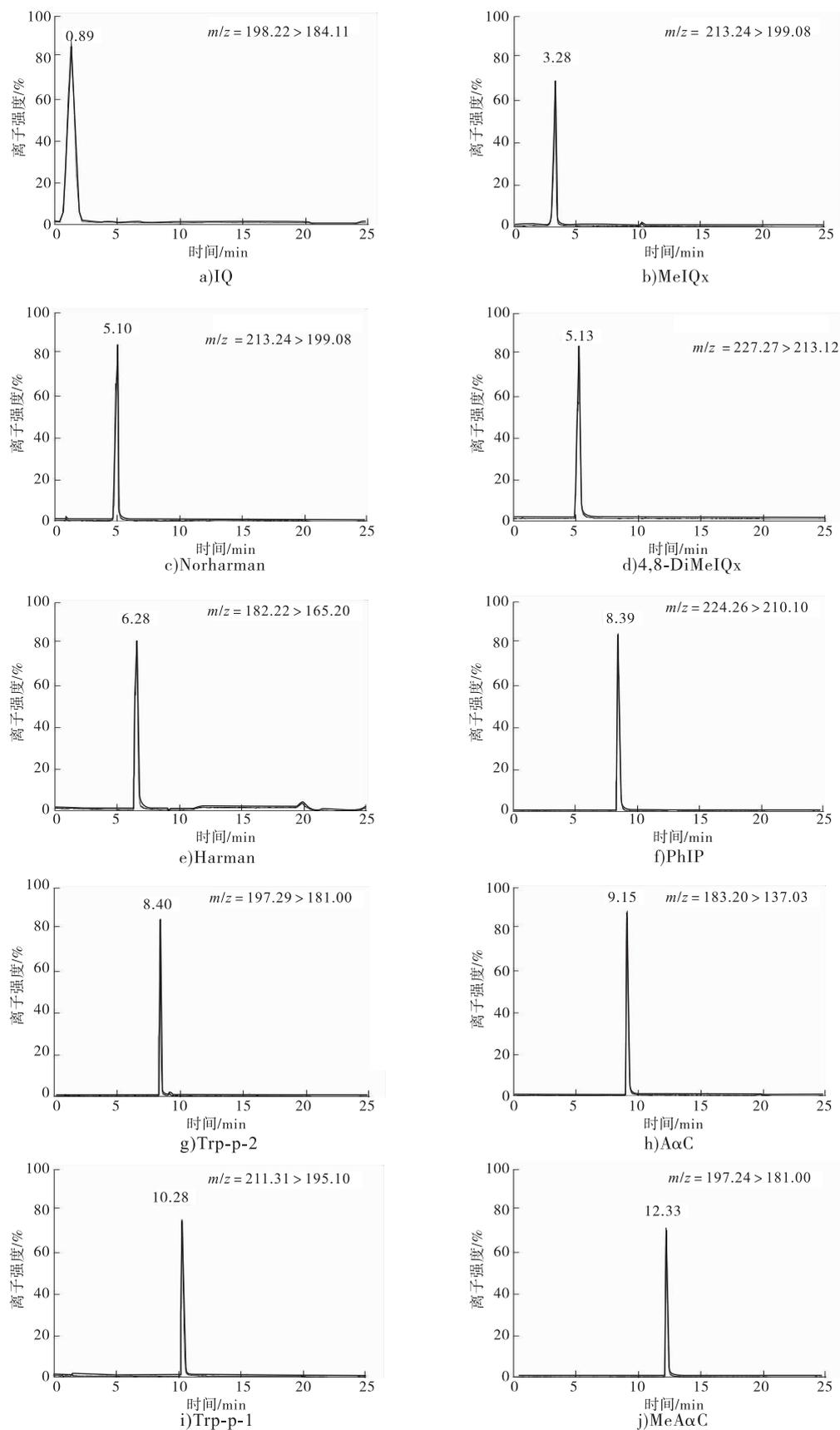


图 1 10 种杂环胺标准品的提取离子流色谱图

Fig. 1 Extraction ion chromatography of 10 HAs

卤汤中均检测到杂环胺,批次1和批次2中杂环胺含量分别为8.718~19.583 ng/g和19.657~35.626 ng/g. A家老汤共检测出7种杂环胺,批次2中杂环胺总含量是批次1的1.8倍.与批次1相比,批次2中Harman, IQ, Norharman, A $\alpha$ C, PhIP和Trp-p-2含量显著增加,特别是Norharman和Harman的含量均是批次1的1.6倍. B家老汤共检测到7种杂环胺,批次2中杂环胺总含量比批次1高16.677 ng/g. 批次2中Norharman, PhIP, MeIQx, Trp-p-2含量与批次1相比,呈现显著性增加( $P < 0.05$ ). 而两批次的4,8-DiMeIQx差异不显著, IQ在批次1中未检出. C家老汤中共检测出4种杂环胺,批次2中杂环胺总含量比批次1中杂环胺总含量高10.939 ng/g. 其中,批次2中Harman, Norharman的含量分别是批次1的3.4倍和2.7倍.

综上可知, Harman和Norharman在3家店铺老汤中均被检出,在批次1中含量变化幅度分别为3.384~1.389 ng/g和3.823~7.361 ng/g,在批次2中变化幅度分别为4.720~5.815 ng/g和9.196~19.936 ng/g,两种杂环胺含量占杂环胺总含量的41%~77%.

这与A. Szterk研究结果基本一致<sup>[11]</sup>.

此外,由3家摊点老汤样品中杂环胺总含量结果可以看出,批次2检测出的杂环胺种类和总含量高于批次1.根据调查获知,批次2老汤比批次1老汤多循环使用约30次,这说明老汤使用循环次数增加,杂环胺含量也随之增加,其安全隐患也进一步加大.值得注意的是,本实验对3家摊点的酱卤鸡腿老汤中杂环胺含量进行测定,发现所有样品均含有杂环胺,而且杂环胺总含量批次间差异较大,这很可能是农贸市场上的酱卤熟制工艺不稳定,或不能定期清理老汤中的杂质所导致.

### 3 结论

本文采用超高效液相色谱串联质谱法对3家市售酱卤鸡腿老汤的杂环胺含量进行分批检测.结果表明,在3家卤汤中均检测到杂环胺,共检出8种杂环胺,总含量最高可达35.626 ng/L.批次2老汤循环使用次数比批次1多近30次,所以其中杂环胺含量显著高于批次1中含量.

此外,在老汤中均检测出Harman和Nor-

表1 3家酱卤鸡腿老汤中杂环胺的含量

Table 1 Contents of HAs in Halogen soups from 3 individual market stalls

ng/g

杂环胺	老汤 A		老汤 B		老汤 C	
	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2	批次 1	批次 2
IQ	2.354 ± 0.090 <sup>a</sup>	9.910 ± 0.030 <sup>b</sup>	ND	0.586 ± 0.030	1.348 ± 0.050 <sup>a</sup>	1.943 ± 0.070 <sup>b</sup>
MeIQx	ND	ND	0.726 ± 0.040 <sup>a*</sup>	1.318 ± 0.020 <sup>b</sup>	ND	ND
4,8-DiMeIQx	0.797 ± 0.050 <sup>*</sup>	0.970 ± 0.010 <sup>*</sup>	2.758 ± 0.080	2.863 ± 0.320	2.158 ± 0.060	2.537 ± 0.080
Harman	3.384 ± 0.150 <sup>a</sup>	5.492 ± 0.026 <sup>b</sup>	4.769 ± 0.150 <sup>a</sup>	5.815 ± 0.180 <sup>b</sup>	1.389 ± 0.100 <sup>a</sup>	4.720 ± 0.170 <sup>b</sup>
Norharman	5.914 ± 0.050 <sup>a</sup>	9.196 ± 0.160 <sup>b</sup>	7.361 ± 0.130 <sup>a</sup>	19.936 ± 0.270 <sup>b</sup>	3.823 ± 0.240 <sup>a</sup>	10.457 ± 0.360 <sup>b</sup>
A $\alpha$ C	0.478 ± 0.028 <sup>*a</sup>	0.657 ± 0.040 <sup>*b</sup>	ND	ND	ND	ND
Trp-p-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PhIP	5.361 ± 0.140 <sup>a</sup>	7.937 ± 0.320 <sup>b</sup>	1.180 ± 0.030 <sup>a</sup>	2.674 ± 0.070 <sup>b</sup>	ND	ND
Trp-p-2	1.295 ± 0.070	1.464 ± 0.030	0.315 ± 0.010 <sup>a*</sup>	0.594 ± 0.010 <sup>b*</sup>	ND	ND
MeA $\alpha$ C	ND	ND	ND	ND	ND	ND
总含量	19.583	35.626	17.109	33.786	8.718	19.657

注: \*表示高于检出限而低于定量限; ND表示未检出; a, b在同一行中(同家老汤)字母不相同,则表示 $P < 0.05$ 差异显著; A, B, C代表不同的采样来源.

harman 两种杂环胺,占杂环胺总含量 41% ~ 77%。虽然国家对此并未规定安全范围,但是处于 ng 级别的 Harman 和 Norharman 已具有致癌性,危害不容忽视。

由此可知,农贸市场个人摊点的酱卤鸡腿安全性相对比较低,随着卤煮时间和次数的增加,杂环胺的含量也在增加。因此建议在酱卤肉制品加工中应科学地规范并严格控制卤煮工艺,同时减少老汤使用次数。

#### 参考文献:

- [1] 唐春红,李海,李侠,等.反复卤煮对老汤品质的影响研究[J].现代食品科技,2015(5):187.
- [2] OZ F,ZIKIROV E. The effects of sous-vide cooking method on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chops[J]. LWT-Food Science and Technology,2015,64(1):120.
- [3] SKOG K,STEINECK G,AUGUSTSSON K,et al. Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues[J]. Carcinogenesis,1995,16(4):861.
- [4] AASLYNG M D,DUEDAHL-OLESEN L,JENSEN K,et al. Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork,beef and chicken barbecued at home by Danish consumers[J]. Meat Science,2013,93(1):85.
- [5] DONG A,LEE J,SHIN H S. Formation of amino-imidazo-azaarenes and carbolines in fried beef patties and chicken breasts under different cooking conditions in Korea[J]. Food Science and Biotechnology,2011,20(3):735.
- [6] 邵斌,彭增起,杨洪生,等.固相萃取-高效液相色谱法同时测定传统禽肉制品中的9种杂环胺类化合物[J].色谱,2011,29(8):755.
- [7] 万可慧,彭增起,邵斌,等.高效液相法测定牛肉干制品中10种杂环胺含量[J].色谱,2012,30(3):285.
- [8] 潘晗.酱肉中Norharman和Harman形成机理的研究[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [9] ARVIDSSON P,BOEKEL M,SKOG K,et al. Kinetics of formation of polar heterocyclic amines in a meat model system[J]. Journal of Food Science,1997,62(5):911.
- [10] 曾茂茂,李洋,何志勇,等.液相色谱-质谱联用法结合主成分分析考察食品中前体物质对HAA生成的影响[J].分析化学,2015,42(1):71.
- [11] SZTERK A. Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: The influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAA content [J]. Journal of Food Composition and Analysis,2015,40:39.