

如皋火腿中挥发性 N-亚硝胺种类和含量分析

魏法山, 徐幸莲*, 周光宏

(南京农业大学食品科技学院, 教育部肉品加工与质量控制重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 用带有氮磷检测器的气相色谱(GC-NPD)测定了从市场上买来的 20 条如皋火腿中的挥发性 N-亚硝胺, 并用 GC-MS 确证 GC-NPD 检测结果。结果表明: 市售如皋火腿中含有 3 种挥发性 N-亚硝胺, 分别为 N-二甲基亚硝胺(NDMA)、N-二乙基亚硝胺(NDEA)和 N-吡咯烷亚硝铵(NPYR), 平均含量分别为 0.20、0.81 和 3.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其中 NPYR 的含量最多; NPYR 的检出率最高为 100%, 其次为 NDEA, 检出率为 95%, NDMA 最小为 85%, NDHA, NPIP 和 NDBA 未检测出。

关键词: N-亚硝基化合物; N-亚硝胺; 如皋火腿

Analysis on Style and Contents of Volatile N-nitrosamines in Rugao Ham

WEI Fa-shan, XU Xing-lian*, ZHOU Guang-hong

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Meat Processing and Quality Control, Ministry of Education, Nanjing 210095, China)

Abstract: The volatile N-nitrosamines of 20 Rugao hams from market, detected by GC-NPD, and the detection result was confirmed by GC-MS. The results showed that 3 volatile N-nitrosamines i.e. N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA) and N-nitrosopyrrolidine are found in Rugao ham and their contents are 0.20, 0.81, 3.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively. The detection rates of NDMA, NDEA and NPYR in Rugao ham are 85%, 95% and 100% respectively. NDHA, NPIP and NDBA are not found in Rugao ham.

Key words: N-nitroso compound; N-nitrosamine; Rugao ham

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0400-05

在如皋火腿的加工过程中会使用亚硝酸盐添加剂, 这种添加剂在肉制品加工中起到了很好的作用, 可以抑制梭状肉毒杆菌的生长繁殖和产生毒素^[1-2], 可以产生理想的粉红色, 对典型腌肉风味的产生起重要作用^[3-4], 还具有抗氧化的效果^[5]。但是, 亚硝酸盐在腌肉中可以转化为亚硝酸, 很容易和次级胺类物质反应产生致癌性物质 N-亚硝胺类化合物^[6]。并且这类化合物一次或多次摄入过量, 可损伤肝脏和破坏血小板, 出现严重的急性中毒现象。如果长期习惯性喜食含亚硝胺类物质食品(腌肉、咸鱼和酸菜等), 就会出现慢性中毒, 导致肝硬化^[7]。于是, 过去有大量的科研工作分析 N-亚硝胺在肉制品中的产生过程, 这些肉制品包括香肠^[8]、腌肉^[9]、可食用的下水肉制品^[10]、培根^[11]等。在这些肉制品中发现的主要挥发性亚硝胺为 N-二甲基亚硝胺

(NDMA)、N-二乙基亚硝胺(NDEA)、N-吡咯烷亚硝铵(NPYR)、N-哌啶烷亚硝胺(NPIP)、N-二丙基亚硝胺(NDPA)和 N-二丁基亚硝胺(NDBA)。这些亚硝胺除了 NDPA 外都在爱沙尼亚的烟熏肉、烤肉、油炸肉以及罐制品肉中检测出来, 其中 NPYR(0.41~24.42 $\mu\text{g}/\text{kg}$)含量最高^[12]。对于干腌肉制品比如金华火腿、如皋火腿中 N-亚硝基化合物的报道很少, 这类肉制品都经过一个非常长的成熟加工期(如皋火腿长达 9 个多月), 在这么长的成熟期间, 干腌肉制品中发生了许多的理化反应, 产生了大量的物质, 使这类肉制品形成了一个非常复杂的体系, 那么这类肉制品中 N-亚硝基化合物的形成、产生是什么状况呢? 马俪珍等人^[13]报道了金华火腿制作和储藏中二乙基亚硝胺的变化, 由于此文献中只有一个二乙基亚硝胺的标样, 所以对于是否还有其它亚硝胺的存

收稿日期: 2007-11-30

基金项目: 江苏省“973”预研项目(BK2005213); 江苏省自然科学基金项目(BE2006323)

作者简介: 魏法山(1976-), 男, 博士研究生, 研究方向为肉制品加工与质量控制。E-mail: 20052008011@njau.edu.cn

*通讯作者: 徐幸莲(1962-), 女, 教授, 博士, 研究方向为肉制品加工与质量控制。E-mail: xlxu@njau.edu.cn

在没有报道。

本研究通过分析干腌肉制品中挥发性 N-亚硝胺的种类和含量,为政府制定干腌肉制品安全政策和对这类肉制品进行安全品质调控提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

16 个月的如皋火腿 20 条,市购。以股二头肌为中心取约 600 g 样品,然后真空包装,分析前-20℃保存。

1.2 仪器

Warring 高速组织捣碎机 美国 Cole-Parmer 公司; K-D 浓缩器; 氮吹仪; 气相色谱-NPD 检测器 美国 Thermo 公司; 气相色谱-质谱联用仪 Walnut Creek, CA, USA。挥发性 N-亚硝胺标样(用甲醇配制成 8 μg/ml 的混合标准工作液): N-二甲基亚硝胺 (NDMA)、N-二乙基亚硝胺 (NDEA)、N-吡咯烷亚硝胺 (NPYR)、N-哌啶烷亚硝胺 (NPIP)、N-二丁基亚硝胺 (NDBA)、N-二己基亚硝胺 NDHA 美国 Sigma 公司; 二氯甲烷、色谱级甲醇 德国 Merck 公司; 无水硫酸钠。

1.3 方法

1.3.1 样品的制备

准确称取 200g 绞碎的样品于 Warring 高速组织捣碎机中,加入 120g 氯化钠和 100ml 超纯水,高速搅拌 2 min,然后转移到全玻璃蒸馏器中,进行蒸汽蒸馏,并且接收瓶中倒入 40ml 的二氯甲烷和少量冰块,并置于冰水中,接收 400ml 馏分,然后往馏分中加入 80g NaCl 和 4g NaOH,搅拌均匀后再进行蒸汽蒸馏,这次接受馏分 300ml,接着加入 40g NaCl 和 6g 酒石酸,搅拌混匀后进行第三次蒸馏,最后接收 250ml 的馏分,接着加入 80g NaCl 溶解混匀,再转移到 500ml 的分液漏斗中,用 160ml 的 CH₂Cl₂ 分四次进行萃取,每次手动振摇 5min,收集到的二氯甲烷萃取液,用无水 Na₂SO₄ 干燥处理后,转移到 K-D 浓缩器中,60℃ 条件下浓缩至 10ml 左右,再用氮吹仪浓缩至 1ml,上机分析测定。

1.3.2 GC-NPD 测定

用外标法进行定性定量分析。色谱条件如下: 色谱柱: TRB-5 型 (60m × 0.25mm × 0.25 μm) 毛细管色谱柱。进样口温度: 250℃; 检测器温度: 300℃。程序升温过程: 初始温度 40℃,保持 4min; 然后以 4℃/min 升至 180℃,保持 2min; 以 10℃/min 升至 220℃,保留 6min。载气: 高纯氮气,恒流速 2.0ml/min; 氢气流量: 2.5ml/min; 空气流量: 100ml/min; 尾吹流量: 15ml/min。进样量: 1 μl,不分流进样,不分流时间 1min,吹扫流量: 30ml/min。

1.3.3 GC-MS 确证

确证分析使用 Varian CP3800 型气相色谱-Varian 1200 L MS/MS 质谱仪进行分析,并配备 CTC Combi-PAL 自动进样器,色谱柱子为 DB-5 型毛细管色谱柱 (30m × 0.25mm × 0.25 μm); 载气为高纯氦气 (99.999%), 恒流速 0.8ml/min; 进样口温度: 250℃,不分流进样; 采用程序升温: 初始温度 40℃,保持 2min,以 5℃/min 升至 55℃,然后以 15℃/min 升至 250℃,保持 5min; 测定采用选择离子监控模式,条件如表 1。

表 1 气相色谱-质谱确证 N-亚硝胺类物质的测定条件
Table 1 Analytical conditions of N-nitrosamines by GC-MS

N-亚硝胺类物质	m/z	保留时间 (min)	M W
N-二甲基亚硝胺 (NDMA)	74	5.173	74
N-二乙基亚硝胺 (NDEA)	88	7.793	88
N-吡咯烷亚硝胺 (NPYR)	100	10.159	100
N-哌啶烷亚硝胺 (NPIP)	114	10.679	114
N-二丁基亚硝胺 (NDBA)	84	12.310	158
N-二己基亚硝胺 (NDHA)	127	15.838	214

1.4 数据处理

采用 excel 分别计算每种挥发性 N-亚硝胺的平均值。

2 结果与分析

2.1 GC-NPD 检测结果

使用气相色谱-有氮磷检测器 (GC-NPD) 测定如皋火腿中挥发性 N-亚硝胺的色谱图如图 1。

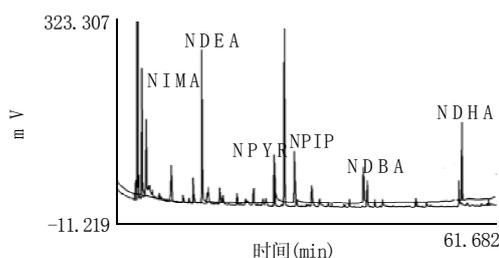


图 1 标准样品色谱图和样品色谱图比较

Fig.1 Comparison chromatogram of standard nitrosamines and sample

使用 GC-NPD 检测如皋火腿样品,以标准样品的保留时间定性,发现有五种挥发性 N-亚硝胺检出,如图 1 所示分别是 NDMA、NDEA、NPYR、NPIP 和 NDHA。

2.2 GC-MS 确证

由于肉制品中尤其是经过长期成熟的干腌肉制品中,含有大量的小分子含氮物质,用气相色谱测定时,有时会出现假阳性现象,所以一般会再用 GC-MS 进行确证,对样品确证图谱如图 2~6。

从图 2~6 中可以看出,GC-NPD 检测出的 5 个挥发

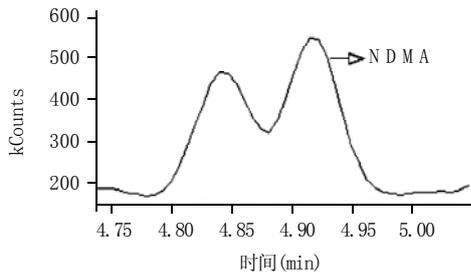


图2 GC-MS 确证样品中的NDMA 色谱图

Fig.2 GC-MS chromatogram of NDMA in sample

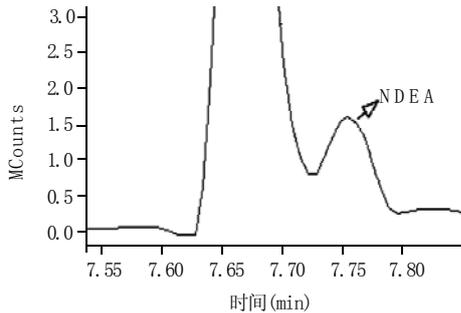


图3 GC-MS 确证样品中的NDEA 色谱图

Fig.3 GC-MS chromatogram of NDEA in sample

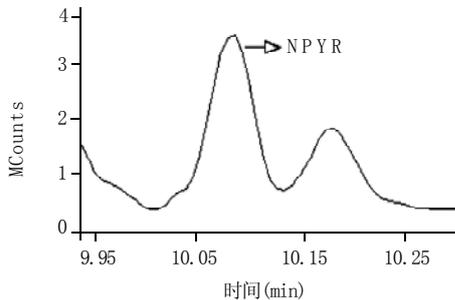


图4 GC-MS 确证样品中的NPYR 色谱图

Fig.4 GC-MS chromatogram of NPYR in sample

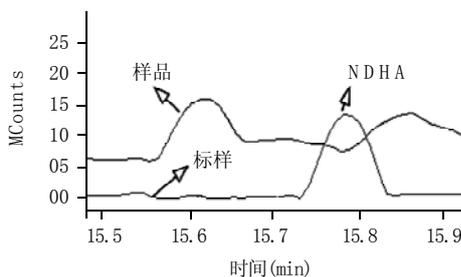


图5 GC-MS 确证样品中的NDHA 色谱图

Fig.5 GC-MS chromatogram of NDHA in sample

性N-亚硝胺中有2个出现了假阳性,就是NPIP和NDHA。

2.3 如皋火腿中挥发性N-亚硝胺的检出情况

从表2中可以看出,市售如皋火腿中检测出了3种挥发性N-亚硝胺,分别为NDMA、MDEA和NPYR,

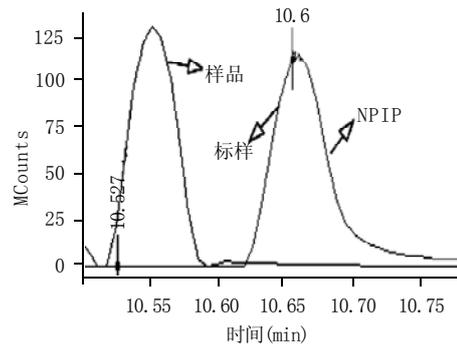


图6 GC-MS 确证样品中的NPIP 色谱图

Fig.6 GC-MS chromatogram of NPIP in sample and standard

表2 如皋火腿中挥发性N-亚硝胺的检出情况(n=20)

Table 2 Profile of volatile N-nitrosamines detected in Ruzhao ham(n=20)

N-亚硝胺	是否检出	检出率(%)	含量范围($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)
NDMA	+	85	0~0.81	0.20
NDEA	+	95	0~3.61	0.81
NPYR	+	100	0.18~16.28	3.85
NPIP	-	-	-	-
NDBA	-	-	-	-
NDHA	-	-	-	-

注: '+' 代表检出, '-' 则代表没有检出。

平均含量分别为0.20、0.81和3.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其中NPYR的含量最多;NPYR的检出率最高为100%,其次为NDEA和NDMA,它们的检出率分别为95%和85%,NPIP和NDBA未检测出。

3 讨论

3.1 GC-MS 确证

GC-NPD在样品中检测到了5种挥发性N-亚硝胺分别是NDMA、NDEA、NPYR、NPIP和NDHA,但是在GC-MS确证下只有NDMA、NDEA和NPYR检出,而NPIP和NDHA则是假阳性现象。出现假阳性现象主要是因为肉制品特别是干腌火腿中,含有大量的含氮化合物,在样品制备过程中难以清除掉,这样用GC-NPD测定时就会有一些含氮物质的出峰时间和标样的出峰时间相同,于是在用标样的保留时间确定色谱峰的性质时就会产生假阳性现象。

3.2 挥发性N-亚硝胺的种类

在本研究中,发现市售的干腌如皋火腿中含有3种挥发性N-亚硝胺,分别为二乙基亚硝胺(NDEA)、二甲基亚硝胺(NDMA)和吡咯烷亚硝胺(NPYR),并且NPYR的含量最高,这与Yurchenko等人^[12]对于爱沙尼亚肉制品中NPYR含量最高的结论相一致。而在肉制品中发现的其他挥发性N-亚硝胺如N-哌啶烷亚硝胺(NPIP)、N-二丁基亚硝胺(NDBA),N-二己基亚硝胺(NDHA)没有检

测出来; NDMA 一般存在于用橡皮袋子装的肉制品中, 这种亚硝胺不是在肉制品中形成的, 而是从肉制品的包装袋子上迁移到肉中的^[14], 在如皋火腿的加工过程中几乎不用包装, 所以这种物质就不会有机会迁移到火腿中去。NPIP 仅在于含有胡椒粉的油炸培根检测到^[15], 如皋火腿加工过程中, 根本不用胡椒粉, 所以在火腿中检测不到 NPIP。NDMA、NDEA 和 NPYR 是食品中主要存在的致癌性 N-亚硝胺, 1980 年对 2826 种西德市场上的食物进行分析表明, 仅有 NDMA、NDEA 和 NPYR 通常被检测到^[16], 肉制品中也是这三种化合物经常被检测出^[12]; N-亚硝胺是由亚硝化试剂和胺类物质一般在酸性环境中反应生成, 但是在碱性环境中也能产生这类致癌性物质^[17]。这些物质的类型与肉制品它们的前提胺类物质有关, 比如甘氨酸、肌氨酸和缬氨酸主要产生 NDMA, L-丙氨酸主要产生 NDEA 和 NDMA, 然而, L-脯氨酸则产生 NPYR^[18]。NPIP 可由尸胺和精胺产生, NPYR 也可由精胺和亚精胺生成^[19]。

3.3 挥发性 N-亚硝胺的含量

一般来说, NDMA 在培根、腌肉、香肠等肉制品中检出, 这些肉制品中报道的最大含量分别为 17、22、12 $\mu\text{g}/\text{kg}$; NDEA 在香肠也检测出来, 其最大含量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; NPYR 在油炸培根、香肠、腌熏肉和西式火腿中的最大含量分别为 100、45、10 和 36 $\mu\text{g}/\text{kg}$; NPIP 在香肠、五香烟熏肉和泰国肉中的报道的最大浓度为 50、9 和 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[20]。Tricker 等^[21]报道, NDMA 在腌肉中的含量一般会在 1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在油炸培根中小于 23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, NDEA 在腌肉中的含量低于 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Yurchenko 等^[12]对爱沙尼亚 2001~2005 年间 386 个肉制品样品进行了 5 种挥发性亚硝胺的分析, 结果发现 NDMA、NDEA、NPYR、NPIP 和 NDMA 的平均水平分别为 0.85、0.36、4.14、0.98 和 0.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 从上面的事实也可以看出, 现在肉制中的挥发性 N-亚硝胺含量比上世纪 90 年代以前的含量大大降低了, 这主要是肉制品行业自觉行为和政府法规条例限制硝酸盐和亚硝酸盐在肉制品中的使用量造成的。另外, 研究发现食品中的 N-亚硝胺含量与烹调方式、蒸煮温度和时间、残留和添加的亚硝酸盐的量、NOC 前提物的含量、亚硝化的催化和抑制剂的存在以及贮藏条件^[22]。而在如皋火腿中 NDMA、MDEA 和 NPYR 的平均含量分别为 0.20、0.81 和 3.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 这可能与如皋火腿的加工工艺和加工条件有关。

3.4 挥发性 N-亚硝胺的检出率

NPYR 的检出率最高为 100%, 其次为 NDEA 和 NDMA, 它们的检出率分别为 95% 和 85%; Yurchenko 等^[12]对爱沙尼亚 2001~2005 年间 386 个肉制品样品进行了 5 种挥发性亚硝胺的分析, 则发现 NDEA、NPYR、NPIP

和 NDMA 分别在 88%、27%、90%、65% 和 33% 的样品中检出。NDMA 在实验动物中一般会对肝、肾和肺产生致癌性作用, NNEA 主要对肝、肾、食管和前胃产生致癌性, 而 NPYR 则可能会导致肝、肺和鼻腔肿瘤^[21]。

3.5 肉制品中挥发性亚硝胺的控制

挥发性 N-亚硝胺是致癌性物质, 那么就应给采取措施控制这类化合物在肉制品中的含量, 首先要限制硝酸盐和亚硝酸盐在肉制品中的食用量, 因为这类物质的形成与肉制品中亚硝酸盐含量的平方成比例^[20], 降低亚硝酸盐含量是控制这类致癌性物质的有效方法, 主要措施就是通过法规条例限制它们在肉制品中的使用量并严格执行; 其次添加挥发性 N-亚硝胺形成阻断剂比如 VC、VE、抗坏血酸棕榈酸酯等; 第三, 就是分解这类化合物, 有研究表明, γ -辐照可以有效地分解肉制品中的挥发性 N-亚硝胺^[23]; 第四改善肉制品的加工工艺和条件, 使挥发性 N-亚硝胺形成的前提物质含量尽可能降低, 并且破坏这类物质的形成环境。

4 结 论

市售如皋火腿中检测出了 3 种挥发性 N-亚硝胺, 为 NDMA、MDEA 和 NPYR, 平均含量分别为 0.20、0.81 和 3.85 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其中 NPYR 的含量最多; NPYR 的检出率最高为 100%, 其次为 NDEA, 检出率为 95%, NDMA 最小为 85%, NDHA, NPIP 和 NDMA 未检测出。

参考文献:

- [1] ANTO B G, RUITER G A. Prevention of clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite-areview [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 213: 165-169.
- [2] YETIM H, KAYACIER A, KESMEN Z, et al. The effects of nitrite on the survival of Clostridium sporogenes and the autoxidation properties of the Kavurma [J]. Meat Science, 2006, 72: 206-210.
- [3] KILLDAY B K, TEMPESTA M S, BAILEY M E, et al. Structural characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implications in the meat-curing reaction [J]. J Agric Food Chem, 1988, 36: 909-914.
- [4] CAMMACK R, JOANNOU C L, CUI X Y. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1411: 475-488.
- [5] NAVARRO J L, NADAL M I, NIETO P, et al. Effect of nitrate and nitrite curing salts on the generation and oxidation of fatty acids in non-fermented sausages [J]. Eur Food Res Technol, 2001, 212: 421-425.
- [6] SHAHIDI F, PEGG R B, SEN N P. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle food [J]. Meat Science, 1994, 37: 327-336.
- [7] 汤林虹, 田应华. 亚硝胺类化合物的危害及控制[J]. 肉品卫生, 2000 (4):10-11.
- [8] SANCHES F, P J, RIOS A, VALCARCEL M, et al. Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction-micellar electrokinetic chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2003,

- 985 (12): 503-512.
- [9] SEN N P, SEAMAN S W, BURGESS C, et al. Investigation on the possible formation of N-nitroso-N-methylurea by nitrosation of creatinine in model systems and in cured meats at gastric pH [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 5088 - 5096.
- [10] DOMANSKA K, KOWALLSKI B. Effect of different storage conditions on N-nitrosamine content in Polish edible offal processed meat products [J]. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 2002, 46: 317-324.
- [11] VECCHIO A J, HOTCHISS J H, BISOGNI C A. N-Nitrosamine ingestion from consumer-cooked bacon [J]. *J Food Science*, 1986, 51: 754 - 756.
- [12] YURCHENKO S, MOLDER U. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100: 1713-1721.
- [13] 马儒珍, 王瑞, 方长发, 等. 金华火腿制作及储藏过程中亚硝胺类化合物的含量变化[J]. *肉品卫生*, 2005(11): 19-21.
- [14] SRN N P. Recent studies in Canada on the occurrence and formation of N-nitroso compounds in foods and food contact materials [J]. *IARC Scientific Publications*, 1991, 105, 232-234.
- [15] GLORIA M B A, BARBOUR J F, SCANLAN R A. Volatile nitrosamines in fried bacon [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45(5): 1816-1818.
- [16] SPIEGELHALDER B, EISENBR G, PREUSSMANN R. Volatile nitrosamines in food [J]. *Oncology*, 1980, 37: 211-216.
- [17] KEEFER L K, ROLLER P P. N-nitrosation by nitrite ion in neutral and basic medium [J]. *Science*, 1973, 181: 1245-1247.
- [18] ENDER F, CEH L. Conditions and chemical reaction mechanisms by which nitrosamines may be formed in biological products with reference to their possible occurrence in food products [J]. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1971, 145(3): 133-142.
- [19] ANSORENA D, MONTEL M C, ROKKA M, et al. Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production [J]. *Meat Science*, 2002, 61: 141-147.
- [20] LIJINSKY W. N-nitroso compounds in the diet [J]. *Mutation Research*, 1999, 443: 129 - 138
- [21] TRICKER A R, PREUSSMANN P. Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanism and carcinogenic potential [J]. *Mutation Research*, 1991, 259: 277-289.
- [22] GRAY J I, REDDY S K, PRICE J F, et al. Inhibition of N-nitrosamines in bacon [J]. *Food Technology*, 1982, 36: 39 - 45.
- [23] AHN H J, KIM J H, JO C, et al. Combined effects of γ -irradiation and a modified atmospheric packaging on the physicochemical characteristics of sausage [J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2004, 71: 51-54.