

含脂食品辐解产物 2-烷基环丁酮的研究进展

张海伟 哈益明 王 锋

(中国农业科学院农产品加工研究所 北京 100094)

摘要 含脂食品被辐照时,食品中的脂肪酸和酰基甘油会分解形成相应的同碳原子数 2-烷基环丁酮(2-alkylcyclobutanones, 2-ACBs)。自发现以来,2-ACBs 一直是含脂辐照食品研究的热点。作为含脂食品辐照的标志性化合物,2-ACBs 可用来检测含脂辐照食品。2-ACBs 的产生及其稳定性受很多因素影响,如辐照剂量、辐照温度与贮藏条件等。同时,2-ACBs 的毒性也一直是含脂辐照食品研究的热点。本文阐述了利用 2-ACBs 检测含脂辐照食品方法的研究现状;影响 2-ACBs 的产生和稳定性的因素;以及 2-ACBs 的毒性研究进展。

关键词 2-烷基环丁酮,辐解产物,辐照食品,检测方法

中图分类号 TL99, TS205, O657

辐照处理能杀灭或减少食品中的致病性微生物、细菌、寄生虫等,能有效提高食品的卫生安全性,延长货架期,食品辐照是发展很快的辐射技术应用领域之一。但是,像其它食品灭菌处理方式一样,食品辐照也会在一定程度上影响其感观和内在品质,产生一些特殊的化合物。2-烷基环丁酮(2-Alkylcyclobutanones, 2-ACBs)就是含脂辐照食品的特异性辐解产物。1972年,LeTellier等^[1]用⁶⁰Co γ 射线对三酰基甘油辐照 60kGy,发现了 2-ACBs。迄今为止,仅在辐照的含脂食品中发现 2-ACBs,任何未辐照食品中从未检测到此类化合物。含脂食品被辐照时,其脂肪酸和酰基甘油分解形成 2-ACBs,它们与母体脂肪酸有相同的碳原子数,且烷基在碳环的 2 号位上。在大多数食品中,棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸[C18:1(9)]、亚油酸[C18:2(9,12)]是主要的脂肪酸,相应的 2-ACBs 产物分别为 2-十二烷基环丁酮(2-dodecylcyclobutanone, 2-DCB)、2-十四烷基环丁酮(2-tetradecylcyclobutanone, 2-TCB)、2-(5'-十四烯基)环丁酮(2-tetradec-5'-enylcyclobutanone, TECB)和 2-(5',8'-十四二烯基)环丁酮(2-tetradeca-5', 8'-dienylcyclobutanone, 5',8'-CB)。一般认为,2-ACBs 是由脂肪酸或甘油三酸酯的羰基氧失去一个电子,再经由重排过程生成^[1]。它们在含脂辐照食品中的含量极微,如 5.0kGy 辐照碎牛肉的 2-DCB 平均浓度为 0.6 μ g/g^[2]。

由于辐照食品含 2-ACBs 的特异性,好多发达国家都在研究用 2-ACBs 检测含脂辐照食品的方法。欧盟和国际食品法典委员会(CAC)已制定了测定 2-ACBs 含量检测含脂辐照食品的标准;2-ACBs 的毒性也一直是含脂辐照食品研究的热点,以决定含脂食品能否辐照,其剂量能否超过 10kGy。FAO/IAEA/WHO 联合专家委员会在 1999 年宣布,超过 10kGy 的辐照食品是安全的,不存在毒理学、营养学和微生物学问题,但文献[3]、[4]认为,2-ACBs 可能有遗传毒性并可加速细胞癌变。

本文概述了近年来利用 2-ACBs 检测含脂辐照食品方法的研究、以及影响 2-ACBs 的产生和稳定性因素和 2-ACBs 毒性问题的研究进展。

1 利用 2-ACBs 检测含脂辐照食品

含脂食品的常规加工过程,如发酵、微波处理、紫外线照射、加热和高压处理等,并不产生 2-ACBs,食品包装在不同的气氛中,如真空、空气和二氧化碳,以及食品贮藏期间也不产生这类环状化合物。因此,2-ACBs 可作为含脂食品辐照的标志性化合物^[5,6],用以检测食品是否被辐照过,还可评估食品辐照剂量^[2,7,8]。Stevenson 等^[9]于 1990 年报道了以 2-ACBs 作为标志物检测辐照鸡肉。1996 年,欧盟标准委员会制定了 5 种鉴定辐照食品的方法标准,其中 EN1785:1996^[10]为辐照含脂肪食品的 2-ACBs

国家“十五”攻关食品安全重大专项基金(2001BA804A23-2)资助

第一作者:张海伟,女,1979年3月出生,2002年毕业于新疆石河子大学,现为中国农业科学院在读博士研究生

通讯联系人:哈益明

收稿日期:初稿 2006-09-05,修回 2006-10-23

的气相色谱/质谱分析。2001 年, 国际食品法典委员会第 24 届会议在欧盟标准基础上批准了 5 种“辐照食品鉴定方法”国际标准, 其中包括采用气-质联机测定 2-ACBs 含量法检测含脂辐照食品。2003 年, 欧盟将 EN1785:1996 修订为 EN1785:2003。

大部分食品中, 棕榈酸和硬脂酸是含量最高的饱和脂肪酸, 一般用其辐解物 2-DCB 和 2-TCB 作为检测含脂辐照食品的主要标志性化合物。由于脂含量和结构特点等不同, 不同含脂食品有不同的最低辐照剂量检测限。据 EN1785:2003, 对辐照 0.5kGy 及以上剂量的生鸡肉, 辐照 1kGy 及以上剂量的鲜蛋、生猪肉、三文鱼和软干酪, 该检测有效。一般认为, 2-ACBs 法适用于含脂大于 1% 的食品, 即 2-ACBs 法对鸡肉猪肉等高含脂量食品和水产品、水果等低含脂食品均有效。

用 2-ACBs 法检测辐照食品通常有三个步骤:

(1) 提取脂肪, 一般采用正己烷溶剂, 将脂肪连同 2-ACBs 一起萃取出来; (2) 萃取和分离 2-ACBs, EN1785 标准采用 Florisil 色谱柱, 淋洗液为正己烷和 2% 乙醚正己烷溶液, 该色谱柱可承载较大的样品量, 但耗长, 有机溶剂耗量大; (3) GC-MS 色谱仪测定 2-ACBs。两次实验室间合作盲测结果表明, 此类方法的检测正确率很高。例如, 5 个实验室对 134 个鸡肉样品 (0、0.5、3.0、5.0kGy) 的 2-DCB 检测的正确率为 99%; 又如, 11 个实验室对 99 个鸡肉样品和液体全蛋样品以及 8 个实验室对 72 个猪肉样品 (辐照剂量均为 0、1.0、3.0kGy) 的 2-DCB 和 2-TCB 的检测成功率均为 100%^[11-13]。2-DCB 和 2-TCB 的浓度虽随吸收剂量增加, 但样品低温贮藏一段时间后这些环状化合物的浓度明显下降, 辐照食品烹调后其 2-ACBs 量也会下降, 且同一实验室内和不同实验室间测得的浓度也有差异。因此, 此法对盲样吸收剂量的评估尚有困难, 需进一步研究, 但足可定性分析样品受到低剂量、中等剂量或高剂量的辐照。

近年来, 欧盟、日韩等世界各国都在研究 2-ACBs 检测法, 目标是简化前处理步骤, 如缩短 2-ACBs 的萃取和分离时间、方便操作、减少溶剂使用量、提高检测灵敏度以及扩大应用范围等。已有较多实验室用 CO₂ 超临界流体萃取法^[14-16]提取 2-ACBs。此法优点很多, 一是可直接从样品中萃取和分离 2-ACBs, 无需提前提取样品中脂肪, 使得萃取时间大为缩短, 检测时间由 EN1785 法的 1.5d 缩短到 4—5h; 二是应用范围可扩大至豇豆、大米等食品, 以及含低浓度辐照组分 (0.5%) 的食品^[17]; 三是提高了萃取的选择性, 检测限可低至 0.1kGy

(大米), 甚或 0.05kGy (豇豆); 四是减少了有机化学试剂的使用, 比 Soxhlet 萃取-Florisil 柱方法减少约 90%^[18]。1999 年, Ndiaye 等^[19]报道, 样品经 Florisil 柱再经银离子色谱柱分离, 可使辐照食品的检测限降低达 0.1kGy, 且可检测到添加于非辐照食品中的 3% 含量的辐照组分, 扩大了 EN1785 标准的应用范围。另外, 使用硅胶色谱、固相微萃取、色谱连用技术 (LC-GC-MS, LC-LC-GC-MS, TLC-HPLC) 等分离 2-ACBs^[20], 也可提高检测选择性和灵敏度。Hamilton 等^[21]用连接酶的免疫吸附剂试验测定含脂食品中的 2-ACBs, 将侧链末端含羧基的 2-十烷基环丁酮连接到一些载体蛋白质如牛甲状腺球蛋白 (BTG)、转铁蛋白 (Tf) 上, 再在兔体内制备多抗隆抗体。这些抗体的交叉反应研究表明, BTG 是良好的载体蛋白质, 其抗体能很好地与 2-十烷基环丁酮和 2-十二烷基环丁酮反应, 此法无需复杂的 GC-MS 设备^[21]。

2 影响 2-ACBs 的产生和稳定性的因素

2-ACBs 的产生受辐照剂量和温度等因素影响, 其稳定性又取决于贮藏时间、温度或烹调过程等条件。

一般而言, 在 1—10kGy 范围内, 大多数含脂辐照食品 (如碎牛肉、鸡肉、猪肉和花生等) 与 2-DCB 和 2-TCB 的生成量有良好线性关系 ($R^2 = 0.92 - 0.99$)^[19,22-25]。样品辐照后立即作此检测, 可根据剂量-2-ACBs 的线性关系检测样品的吸收剂量。

辐照温度对 2-ACBs 的产生有显著影响, 鸡肉样品-80℃辐照产生的 2-ACBs 浓度几乎是 20℃辐照时的一半。

包装对含脂辐照食品的 2-ACBs 产生影响不大。空气、CO₂ 和真空包装鸡肉辐照产生的 2-DCB 的浓度相似^[26], 且减少包装内的氧气压并不减少 2-ACBs 的产生^[27]。

剂量率可能影响 2-ACBs 产生的浓度。2.5kGy 和 5.0kGy 辐照碎牛肉, 剂量率为 (2.25—3.00)kGy/s 的电子束辐照产生的 2-DCB 浓度显著大于 ($p > 0.05$) 剂量率为 1.01Gy/s 的 γ 射线辐照^[27]。

4℃贮藏 18d 后, 2-DCB 的浓度显著下降, 但其与辐照剂量的线性关系依然存在, 1kGy 辐照食品的检测并无困难^[7]。辐照木瓜 10℃贮藏 21d, 其辐照剂量检测限由 0.1kGy 上升为 2kGy^[17]。贮藏过程中, 烷基链越短的环丁酮损失越多, 而鸡肉和羊奶干酪的环丁酮损失大于芒果。芒果中 2-ACBs 主要在果核内生成, 其 2-ACBs 贮藏损失可能源于环丁

酮挥发, 或部分 2-ACBs 氧化成了内酯^[20]。

辐照后鸡肉经过烹调加热, 其 2-DCB 量显著减少, 但与剂量仍保持线性关系^[28], 故此法可用于检测辐照肉的烹调加工。

2-ACBs 的产生还受食品脂肪酸结构的影响。Kim 等^[29]报道, 10kGy 辐照处理游离脂肪酸(棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸)和三酰基甘油(三棕榈酸甘油酯、三硬脂酸甘油酯、三亚油酸甘油酯和三亚麻酸甘油酯)结果显示饱和脂肪酸中产生的 2-ACBs 浓度低于不饱和脂肪酸, 但三酰基甘油的情况却相反, 饱和的三酰基甘油中产生的 2-ACBs 高于不饱和三酰基甘油, 原因尚待研究。

3 2-ACBs 的毒理学分析

关于 2-ACBs 的研究热点还有毒理性研究。20 世纪 70、80 年代曾有许多辐照食品动物试验, 如老鼠和狗及其后代喂食 60kGy 辐照鸡肉, 理所当然, 这也喂食了环丁酮, 当时的结果显示, 辐照鸡肉对试验动物的健康无负面影响, 也无证据表明长期食用含脂辐照食品是有害的^[30]。但欧盟认为, 以前的试验研究既未进行 2-ACBs 对特殊分子或细胞作用的试验, 也未研究对克隆肿瘤细胞的促进作用, 故不能认为 2-ACBs 对人体完全无害。2000 年前, 2-ACBs 的毒理特性研究尚未大范围开展, 因为缺少必要的 2-ACBs 标准物, 也认为辐照食品产生的 2-ACBs 浓度仅 0.2—2 $\mu\text{g/g}$, 不会显著影响人体健康。但有学者认为^[30], 若人们终生食用辐照食品, 或添加有 2-ACBs 的辐照成分的非辐照食品, 则消费者会终生暴露于低浓度的辐解化合物下。最近, 欧盟研究证明^[3], 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 30min, 2-TCB 对克隆人体细胞 HT29 或 HT29cl19A 均未产生细胞毒性和遗传毒性, 即使在 400 $\mu\text{mol/L}$ 的高浓度时也未出现; 但诱导时间延长至 1—2d, 大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度会对细胞产生生殖毒性。2002 年, Raul 等^[4]报道 2-ACBs 能使化学致癌物质致动物克隆细胞癌变的速度增大。2005 年, Knoll 等^[31]用彗星试验和 23 号荧光原位杂交 (FISH) 技术发现 2-DCBs 使人细胞在体外 DNA 链断裂和染色体重排的可能性增加两倍^[31]。但是, 也有报道质疑 2-ACBs 的生殖毒性作用。大肠杆菌^[32]和鼠伤寒沙门氏菌^[33,34]的细菌突变试验结果表明, 无论是否经过代谢激活, 2-DCB 都不具有致突变性。美国东部研究中心用 6 种目前使用的毒理学分析试验方法, 包括细菌抗变异试验、5-氟-尿嘧啶遗传突变试验、酵母 DEL 试验、Pro-ToxTM 试验及在人的 TK6 淋巴细胞生成 6-硫鸟嘌呤抗变异试验, 评价 2-十二烷基环丁酮的毒理学

特性, 结果证明辐照肉中低浓度的 2-ACBs 对人类健康无显著危害^[35]。迄今为止, 2-ACBs 的毒理性问题尚无定论。

4 结论

辐照处理含脂食品产生 2-ACBs, 作为含脂辐照食品的标志性化合物, 可用其检测含脂辐照食品。目前, 主要研究有 CO_2 超临界流体萃取法、气-质连用技术等前处理方法, 缩短 2-ACBs 萃取和分离时间、方便操作、减少溶剂使用量、提高检测灵敏度以及扩大方法应用范围等。2-ACBs 的产生和稳定性受辐照剂量、辐照温度、辐照气氛及贮藏时间、温度或烹调过程等因素影响。因此, 进一步研究 2-ACBs 产生和变化规律, 可更好地利用 2-ACBs 检测含脂辐照食品或评估其吸收剂量。同时, 2-ACBs 的毒理学研究有待深入。

参考文献

- 1 LeTellier P R, Nawar W W. *Lipids*, 1972, 7(1): 75-76
- 2 Gadgil P, Hachmeister K A, Smith J S, *et al.* *J Agric Food Chem*, 2002, 50(20): 5746-5750
- 3 Knolla N, Anja Weiseb A, Claussenb U, *et al.* *Mutat Res*, 2006, 594(1-2): 10-19
- 4 Raul F, Gosse F, Delincee H, *et al.* *Nutr Cancer*, 2002, 44(2): 189-191
- 5 Nawar W W. *Food Rev Int*, 1986, 2(1): 45-78
- 6 Stevenson M H. *Trends Food Sci Technol*, 1992, 3: 257-262
- 7 Boyd D R, Crone A V J, Hamilton J T G. *J Agric Food Chem*, 1991, 39(4): 789-792
- 8 Lee H J, Byun M W, Kim K S. *J Food Protect*, 2000, 63(11): 1563-1569
- 9 Stevenson M H, Crone A V J, Hamilton J T G. *Nature*, 1990, 344(15): 202-203
- 10 Anonymous EUROPEAN Committee for Standardization. *Foodstuffs*. EN 1785, 1996b
- 11 Schreiber G A, Stevenson M H, Meier W. Recent advances on the detection of irradiated food. Luxembourg: Commission of the European Communities, 1994, (Report EUR/14315/en)
- 12 Stevenson M H, Kilpatrick D J, McMurray C H. *FAO/IAEA Report*, Vienna, Austria, 1994
- 13 Stevenson M H. *Detection methods for irradiated foods-current status*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996, 269-284
- 14 Horvatovich P, Miesch M, Hasselmann C, *et al.* *J Chrom*

- A, 2000, **897**(1-2): 259-268
- 15 Horvatovich P, Michel M, Hasselmann C, *et al.* J Chrom A, 2002, **968**(1-2): 251-255
- 16 Lembke P, Bornert J, Engelhardt H. J Agric Food Chem, 1995, **43**(1): 38-45
- 17 Stewart E M, Moore S, McRoberts W C, *et al.* Food Sci Technol Today, 1998, **12**(2): 103-106
- 18 Stewart E M, McRoberts W C, Hamilton J T G, J AOAC Int, 2001, **84**(3): 976-986
- 19 Ndiaye B, Horvatovich P, Miesch M, *et al.* J Chrom A, 1999, **858**(1): 109-115
- 20 Delincee H. Radiat Phys Chem, 2002, **63**(3-6): 455-458
- 21 Hamilton L, Elliot C T, Boyd D R, *et al.* Detection methods for irradiated foods-current status. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1996, 285-292
- 22 Crone A V J, Hamilton J T G, Stevenson M H. Int J Food Sci Technol, 1992, **27**(6): 691-696
- 23 Lee H J, Lee M Y, Kim K S. J Food Sci Nutr, 1999, **4**(4): 270-275
- 24 Park E R, Kim E A, Kim K S. Food Sci Biotechnol, 2001, **10**(1): 84-89
- 25 Stewart E M, Moore S, Graham W D, *et al.* J Sci Food Agric, 2000, **80**(1): 121-130
- 26 Stevenson M H, Crone A V J, Hamilton J T G. Radiat Phys Chem, 1993, **42**(1-3): 363-366
- 27 Ndiaye B, Jamet G, Miesch M, *et al.* Radiat Phys Chem, 1999, **55**(4): 437-445
- 28 Crone A V J, Hamilton J T G, Stevenson M H. J Sci Food Agric, 1992, **58**(2): 249-252
- 29 Kim K S, Lee J M, Seo H Y, *et al.* Radiat Phys Chem, 2004, **71**(1-2): 45-49
- 30 Marchioni E, Raul F, Burnouf D, *et al.* Radiat Phys Chem, 2004, **71**(1-2): 147-150
- 31 Knoll N, Weise A, Glei M, *et al.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2005, **371**(Suppl. 1): R131-R133
- 32 Sommers C H. J Agric Food Chem, 2003, **51**(21): 6367-6370
- 33 Gadgil P, Smith J S. J Food Sci, 2004, **69**(9): 713-716
- 34 Sommers C H, Schiestl R H. J Food Prot, 2004, **67**(6): 1293-1298
- 35 Sommers C H. Japanese research association for food irradiation, Japanese: Japanese Research Association, 2005, 7-11

Progresses in studies on 2-alkylcyclobutanones in irradiated lipid-containing foods

ZHANG Haiwei HA Yiming WANG Feng

(Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094)

ABSTRACT When foods are irradiated, the free fatty acids and triacylglycerides in the food are decomposed to 2-alkylcyclobutanones (2-ACBs), which have been one of the focuses in food irradiation studies since they were discovered in irradiated lipid-containing foods. As specific markers, 2-ACBs could be used to detect irradiated food. The production and stability of 2-ACBs are affected strongly by the irradiation dose and temperature and preservation conditions, etc. On the other hand, potential health hazard assessments of 2-ACBs have been studied extensively. Recent progresses in 2-ACBs detecting methods from irradiated food, toxicological studies on 2-ACBs, and factors affecting production and stability of 2-ACBs are reviewed in this paper.

KEYWORDS 2-alkylcyclobutanones, Radiolytic products, Irradiated food, Detection method

CLC TL99, TS205, O657