

包装形式和自由基清除剂对 辐照特异性产物 2-十二烷基环丁酮的影响规律研究

张海伟 王 锋 周洪杰 尹青岗 哈益明

(中国农业科学院农产品加工研究所/农业部辐照产品质量监督检验测试中心 北京 100094)

摘要 研究分析了不同的包装形式、添加自由基清除剂以及在贮藏过程中对辐照棕榈酸及牛肉中辐解产物 2-十二烷基环丁酮变化规律的影响。采用硅胶层析柱-气相色谱/质谱联用技术萃取分离和检测 2-十二烷基环丁酮。结果表明, 隔光包装会显著降低辐照样品中 2-十二烷基环丁酮的产生, 减少包装内氧气含量并不能导致 2-十二烷基环丁酮的含量减少, 随着贮藏时间延长, 不同包装形式内 2-十二烷基环丁酮的变化趋势基本一致。添加自由基清除剂可以明显降低样品中 2-十二烷基环丁酮浓度, 随着贮藏时间延长这种作用逐渐减弱。

关键词 2-十二烷基环丁酮, 自由基清除剂, 包装形式, 辐照牛肉, 变化规律

中图分类号 TL99, TS205

食品辐照经过几十年的研究已被证明是一种有效提高食品安全性和延长食品货架期的食品加工方法^[1]。到目前为止, 已有 40 多个国家批准了 100 多种辐照食品。我国食品辐照规模不断扩大, 2005 年中国经过辐照处理的食品已达到 14.5 万吨, 占世界辐照食品总量的 36%, 辐照量位居世界第一^[2]。

为了促进辐照食品的国际贸易、便于执法部门进行市场监管以及增加消费者对辐照食品的信心, 世界各国都积极致力于发展鉴定辐照食品的分析方法。目前国际上对鉴别辐照牛肉、禽肉、猪肉等含脂食品主要有利用辐照形成的挥发性碳氢化合物、有机过氧化物和 2-烷基环丁酮 (2-Alkylcyclobutanones, 2-ACBs) 三种方法。其中 2-ACBs 类化合物是特异性辐解产物, 可作为含脂辐照食品的标志化合物用来检测食品是否经过辐照处理^[3], 在可控条件下还可评估食品辐照剂量^[4,5], 在多种检测方法中占有优势。1972 年, LeTellier 等^[6]用 ^{60}Co γ 射线对三酰基甘油辐照 60kGy, 首次发现了 2-ACBs。Stevenson 等^[7]于 1990 年首先报道了以 2-十二烷基环丁酮 (2-dodecylcyclobutanone according, 2-DCB) 作为标志物检测辐照鸡肉。2-DCB 烃基链较短且是饱和的, 相对其它 2-ACBs 较为稳定, 且由于在大部分食品中, 棕榈酸是含量较高的饱和脂肪酸, 用其辐解物 2-DCB 作为检测含脂辐照食品的主要标志性化合物尤显得更为实用。国外很多学者都围绕

2-DCB 开展研究^[8,9]。本研究在前人研究的基础上选择 2-DCB 进行分析。2-DCB 在含脂辐照食品中的含量不高, 而且其浓度和稳定性受辐照、贮藏及加工条件的不同而不同。因此报道中对 2-DCB 变化规律的研究结果不尽相同^[10,11], 对含脂辐照食品中 2-DCB 变化规律的全面分析也未见报道。含脂辐照食品中 2-DCB 浓度与辐照剂量 (0.5~10.0 kGy) 呈显著线性关系, 即使贮藏一段时间后这种线性关系依然存在^[12,13], 因此不仅可以利用 2-DCB 鉴定牛肉是否经过辐照, 而且还可以利用 2-DCB—剂量响应关系评估牛肉的吸收剂量。但是大多数肉制品往往会添加自由基清除剂来抑制脂肪氧化, 也会采用不同的包装形式, 如真空包装, 充氮包装, 隔光包装甚至也可能是普通的有氧包装, 这些条件的改变可能会影响 2-DCB 的产生和变化趋势, 对利用 2-DCB 鉴定含脂辐照食品产生很大影响。本文将以商业纯棕榈酸和牛肉为实验对象, 分析研究不同的包装形式、添加自由基清除剂以及在贮藏过程中对辐照样品中辐解产物 2-DCB 的变化规律。

1 实验材料和方法

1.1 材料和仪器设备

1.1.1 实验样品 牛肉样品为牛腩部位, 购于北京超市发超市; 纯棕榈酸 (>99%) 购于美国

国际原子能机构国际合作项目基金—食品辐照质量标准体系的建立和完善 (CPR-5-016) 项目

第一作者: 张海伟, 女, 1979 年 3 月出生, 2008 年于中国农业科学院农产品加工研究所获博士学位

通讯联系人: 哈益明, hayiming@sina.com

收稿日期: 初稿 2008-05-07, 修回 2008-07-21

Sigma-Aldrich; 茶多酚 (EGCG > 94%) 购于 DSM 帝斯曼 (中国) 有限公司; 迷迭香提取物购于海南舒普生物科技有限公司;

1.1.2 实验设备 Polaris Q 型气相色谱质谱联用仪 (美国热电公司), Xcalibur Station 化学工作站; 扩口玻璃层析柱 (1.8 cm×30 cm, 上海锦华层析设备厂); RE-2000 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); KQ-200VDB 型双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 真空包装袋 (尼龙/聚乙烯, 厚度 60 μm), 铝箔袋 (聚酯/铝箔/尼龙/聚丙烯, 厚度 120 μm) (河北旭日纸塑包装公司);

1.1.3 药品与试剂 正己烷 (色谱纯, 天津市四友生物医学技术有限公司); 无水乙醚 (化学纯, 北京化学试剂公司); 2-十二烷基环丁酮标样 (99%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 无水硫酸钠 (分析纯, 北京化学试剂公司) 在马弗炉中 550℃ 下灼烧 5 h, 除去杂质; 弗罗里硅土 (Florisil, 600-100 目, PR 级, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。实验所用的玻璃仪器先用自来水清洗, 再于铬酸洗液中浸泡过夜, 使用前再依次用洗洁精、自来水、去离子水洗净烘干后备用。

1.2 实验方法

1.2.1 肉样处理 牛腩样品, 用孔径 3 mm 的绞肉机绞碎, 辐照前后于冰箱 (4±1)℃ 冷藏。

1.2.2 辐照处理 辐照在中国农业科学院原子能利用研究所的 ^{60}Co γ 辐照源进行。辐照吸收剂量分别为 5 kGy 和 10 kGy, 剂量率为 0.5 kGy/h, 辐照温度 (25±2)℃。吸收剂量采用重铬酸银剂量计标定。

1.2.3 样品制备 取约 50g 辐照牛肉糜, 放入 250mL 三角瓶, 加入 150 mL 正己烷, 超声萃取 30min。萃取液经无水 NaSO_4 过滤除水后, 旋转蒸发得到脂肪, 备硅胶层析柱分离提取用; 取约 0.35 g 辐照棕榈酸溶于 10 mL 正己烷中, 备硅胶层析柱分离提取用。每个样品分别设 3 个重复。

1.2.4 硅胶柱的制备及分析 使用前, 置硅胶于 100℃ 烘箱活化 12 h。在干燥器中冷却后, 硅胶中加入质量分数为 4% 的超纯水以去活化, 转入三角瓶并封口。振摇此混合物至少 15 min, 直至不含结块并能自由流动。去活化硅胶于干燥器中平衡 12 h 备用, 且在三日内是稳定的。取 30g 去活化硅胶, 加入正己烷浸泡并搅拌均匀, 然后匀速装柱, 顶部加入 1 cm 无水 NaSO_4 (用之前在 550℃ 灼烧 5 h 去杂质)。先以 2 倍柱体积的正己烷淋洗柱子, 然后将辐

照样品完全溶于少量正己烷中, 加入硅胶柱。先用 150 mL 正己烷以 2 mL/min 的速度淋洗层析柱, 并弃之。再用 480 mL 1% 的乙醚/正己烷溶液 (v/v) 以 2 mL/min 的速度淋洗, 收集最后的 250mL 淋洗液, 用真空旋转蒸发仪 (35℃) 浓缩至 5mL 左右, 进一步用氮气浓缩至 0.5 mL, 待测。

1.2.5 GC-MS 色谱条件 参照 Kim 等^[14]的方法, 并加以改进。Te-5 毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 载气 He , 1.0 mL·min⁻¹; 不分流, 柱前恒压 35 kPa; 进样量 2 μL; 进样口温度 250℃, 接口温度 280℃, 起始柱温 120℃, 保持 1 min, 以 15℃/min 至 160℃, 无保留; 再以 0.5℃/min 至 175℃, 无保留; 再以 30℃/min 至 290℃, 保留 10min, 检测温度 250℃。质谱条件: 离子源温度 250℃, 电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 全扫描 (SCAN) 质量范围: 40~250 (amu); 选择离子检测 (SIM) 选择的质量碎片 m/z : 98、112。

2 结果与分析

2.1 2-DCB 的 GC/MS 分析

2-DCB 由含脂食品中的棕榈酸或含棕榈酸的甘油三酸酯经辐照后形成, 是含脂辐照食品特异性环丁酮类辐解产物中的一种, 含有 16 个碳原子, 烷基在碳环的 2 号位上。未辐照棕榈酸样品、10 kGy 辐照棕榈酸及 5 kGy 辐照牛肉样品经 GC/MS 分析检测, 其色谱图及 2-DCB 色谱峰的质谱图分别见图 1 和图 2。

从图 1 可以看出, 2-DCB 标准样品的保留时间为 17.3 min, 检测辐照样品时, 在相同的出峰时间均检测到 2-DCB, 且可以达到良好的分离效果 (见图 1c 和 d); 未辐照棕榈酸样品经过相同的处理, 没有检测到 2-DCB (见图 1b), 证明了 2-DCB 为辐照样品的特异性辐解产物。Stewart 等^[15]研究在电子碰撞电离质谱分析过程中, 2-DCB 形成 $m/z=98$ 和 112 的离子碎片, 两者的比接近 4.0~4.5:1。在本实验条件下, 2-DCB 标准样品形成 $m/z=98$ 和 112 的离子碎片, 两者的比约为 6.0~6.5:1 (见图 2a); 辐照棕榈酸与辐照牛肉中 2-DCB 形成的 $m/z=98$ 和 112 的离子碎片之比分别约为 6.4:1 和 6.2:1 (见图 2b 和 c)。因此从保留时间和离子比率来看, 本实验方法萃取分离 2-DCB 效果良好。

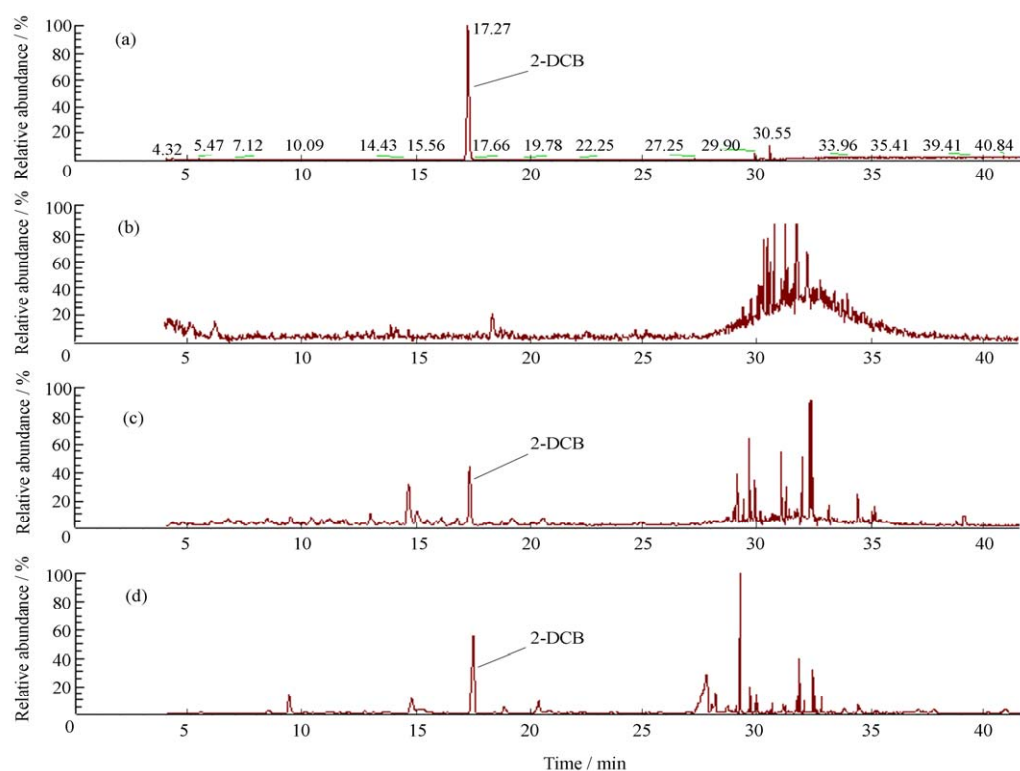


Fig. 1 Chromatograms (selected ion monitoring of the sum of ions 98 and 112) of standard 2-dodecylcyclobutanone (a) and unirradiated (b) and 10 kGy irradiate palmitic acid (c) and 5 kGy(d) (targeted) irradiated beef patties

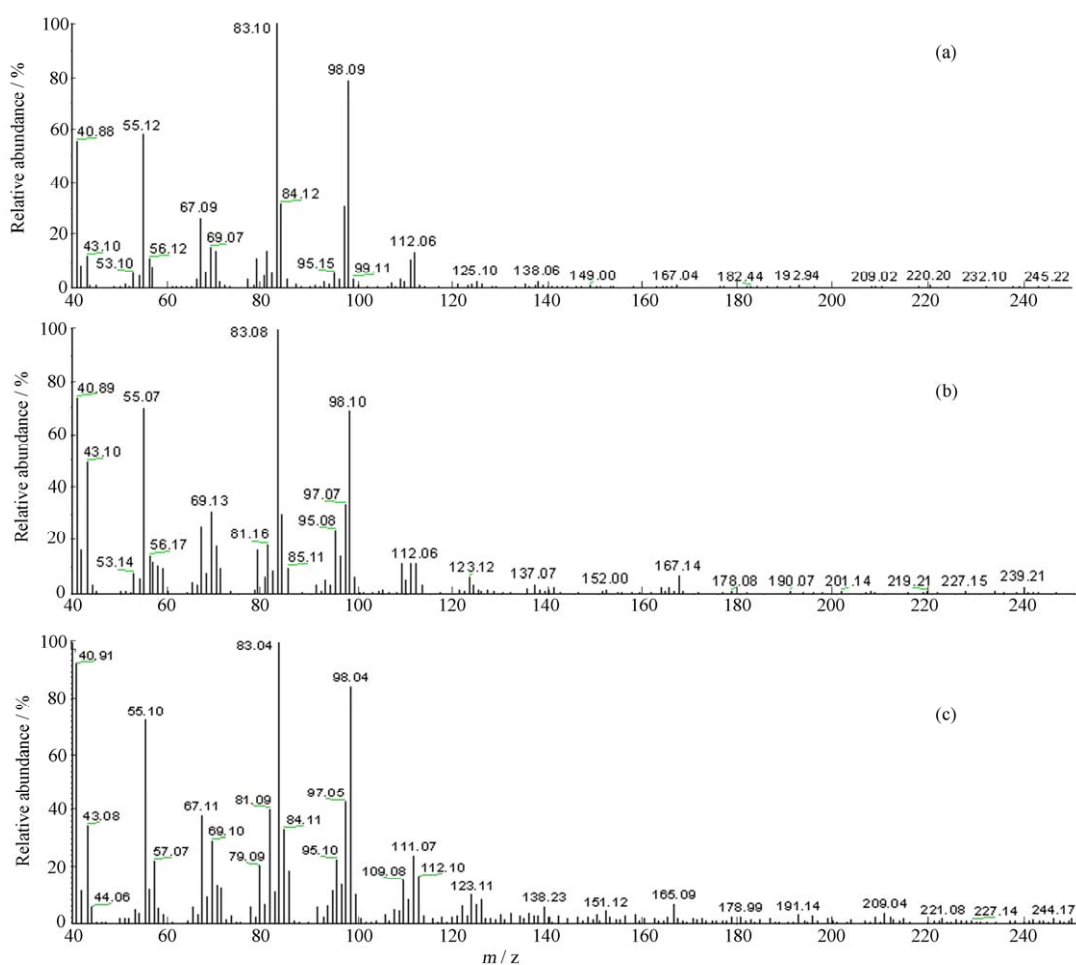


Fig. 2 Mass spectra of the peak attributed to the standard 2-dodecylcyclobutanone (a) and the 2-dodecylcyclobutanone extracted from 10 kGy irradiated palmitic acid (b) and from 5 kGy irradiated beef patties (c), respectively

2.2 包装形式对辐照牛肉中 2-DCB 的影响作用

棕榈酸和牛肉均分别采用铝箔袋隔光包装、真空包装、充氮包装和普通有氧包装四种方式, 分别接受 10 kGy 和 5 kGy 辐照。不同的包装形式对 2-DCB 产生量和稳定性的影响结果见表 1。

由表 1 可知, 样品采用铝箔袋隔光包装经辐照后产生的 2-DCB 浓度显著低于采用透光包装的产生量($P<0.05$)。而且隔光包装的辐照牛肉样品在 4℃ 冷藏条件下贮藏一周, 2-DCB 含量没有显著变化。表明 2-DCB 在生成过程中及生成以后的稳定性均

受到光的显著影响, 光起着一种催化剂的作用。真空包装, 充氮包装和有氧包装对辐照棕榈酸样品中 2-DCB 的产生量没有显著影响; 包装在真空条件下辐照牛肉样品中 2-DCB 浓度显著大于其它包装内的含量, 但是在贮藏一周后, 包装形式对 2-DCB 浓度的影响逐渐消失, 不同包装条件下辐照牛肉中 2-DCB 含量没有显著差异。相对于贮藏初期, 除隔光包装外, 其它包装形式内 2-DCB 浓度均减少, 且降低幅度相似, 约为初始的 15%。说明氧气对辐解产物 2-DCB 的产生没有促进作用, 其稳定性与包装气氛没有显著关系。

Table 1 Effect of package style on the concentration of 2-DCB ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) in 10 kGy irradiated palmitic acid and in 5 kGy irradiated beef patties after the irradiation treatment

Experimental stuff	Storage time / d	Package style				Average RSD ($n=3$) / %
		In presence of air, prevented from light	Under vacuum	In presence of N_2	In presence of air	
Palmitic acid	2	0.197±0.008 ^a	0.860±0.113 ^b	0.932±0.048 ^b	0.817±0.004 ^b	5.8
Beef	2	1.180±0.016 ^a	1.850±0.179 ^c	1.469±0.016 ^b	1.320±0.042 ^{ab}	3.8
	8	1.236±0.006	1.363±0.014	1.230±0.014	1.126±0.008	0.8

Note: Mean values $\pm$ sd with different letters within a row (a-c) indicate significant ($P<0.05$) differences which was determined by One-way ANOVA.

牛肉糜、棕榈酸采用铝箔袋避光包装, 辐照后 2-DCB 产生量显著低于其它透光包装样品中产生的量, 而且在 4℃ 冷藏条件下贮藏一周, 2-DCB 浓度保持稳定。样品在真空、氮气和空气中包装, 对 2-DCB 的产生量没有显著影响, 并且在贮藏过程中其变化趋势一致。一般认为 2-ACBs 的形成机理是含脂食品接受辐照时, 其中的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^[6]。由实验结果可以推测出, 在这个过程中光起到了催化剂的作用, 促使 2-DCB 的形成; 而且在随后的贮藏过程中, 2-DCB 发生反应, 如氧化反应, 生成内酯类化合物^[16]也需要光的作用。Stevenson 等^[17]亦有相似报道, 鸡肉包装在空气、真空和 CO_2 气氛中接受 2.5 kGy 辐照, 结果形成 2-DCB 的浓度没有显著差异。Ndiaye 等^[18]研究报道减少包装内的氧气压力亦不能使辐照鸡肉中 2-DCB 产生量降低^[18]。本实验得到相同的结果, 说明在辐照及随后的贮藏过程中, O_2 对 2-DCB 的形成和反应没有起到显著作用。

2.3 添加自由基清除剂对辐照牛肉中 2-DCB 浓度的影响

茶多酚和迷迭香作为天然抗氧化剂, 添加到肉

品中以清除自由基, 阻断自由基链式反应的形式抑制辐照肉及制品脂肪氧化, 所以又可以称为自由基清除剂。二者添加浓度均为 0.3g/kg 样品, 对 2-DCB 产生量和稳定性的影响结果见表 2。

添加自由基清除剂后显著抑制辐照棕榈酸和牛肉样品中 2-DCB 的产生 ($P<0.05$), 但随着贮藏时间的延长对 2-DCB 的稳定性影响作用逐渐减弱。与对照辐照牛肉样品中 2-DCB 浓度变化相似, 添加自由基清除剂后, 辐照牛肉中 2-DCB 含量在贮藏过程中逐渐下降。在两周贮藏末期, 添加与未添加自由基清除剂的辐照牛肉样品中 2-DCB 浓度没有显著差异。表明 2-DCB 的产生是自由基参与的过程, 添加自由基清除剂后显著减少了辐解产物 2-DCB 的生成; 在贮藏过程中, 2-DCB 发生反应导致含量减少, 在此过程中自由基的作用不再是主要作用, 因此自由基清除剂的作用也在逐渐减弱。

辐照前, 样品中添加茶多酚和迷迭香自由基清除剂可以显著抑制 2-DCB 的形成; 但是在 4℃ 贮藏两周后, 添加与未添加茶多酚的辐照牛肉样品中 2-DCB 浓度基本相同。茶多酚和迷迭香的清除自由基的原理是通过提供氢原子, 与自由基结合, 从而阻断自由基进一步反应。这证明 2-DCB 的生成也是

自由基促使反应的过程。但是 2-DCB 一旦形成，接下来的反应变化过程自由基可能没有起到主要作用，因为在贮藏的后期自由基清除剂的作用逐渐消失。

Table 2 Effect of adding free radical scavengers on the concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) of 2-DCB in 10 kGy irradiated palmitic acid and 5 kGy irradiated beef patties after the irradiation treatment

Experimental stuff	Storage time / d	Free radical scavengers			Average RSD (n=3)/ %
		Control group	Tea polyphenols	Rosemary	
Palmitic acid	3	0.820±0.009 ^a	0.277±0.011 ^b	0.224±0.014 ^b	3.8
	0	1.946±0.138 ^a	1.650±0.059 ^b	—	5.3
Beef	3	1.788±0.015 ^a	1.530±0.006 ^b	—	0.6
	14	1.023±0.031	1.066±0.057	—	4.2

Note: Mean values $\pm$ sd with different letters within a row (a or b) indicate significant ($P<0.05$) differences which was determined by one-way ANOVA.

3 结论

综上所述，铝箔袋避光包装能显著降低辐照样品中 2-DCB 的产生量，且在贮藏过程中含量稳定；样品包装在不同的气氛中进行辐照，对 2-DCB 的生成和稳定性没有显著影响；添加自由基清除剂可以减少辐照牛肉中 2-DCB 的形成，在贮藏过程中 2-DCB 浓度变化趋势与对照相似。因此，由这些变化规律，根据含脂辐照食品的包装形式及加工过程就不仅可以利用 2-DCB 鉴定含脂辐照食品是否经过辐照，而且可以利用 2-DCB 浓度—吸收剂量线性关系对样品的吸收剂量进行评估。但是 2-DCB 的产生量与稳定性还可能受到辐照剂量率、剂量均匀性、辐照场所温度、贮藏条件等多种因素影响，也会受到肉制品中添加的食盐、色素、调味料等成分对 2-DCB 含量可能会产生影响作用，为更好地利用 2-DCB 浓度鉴定含脂辐照食品的吸收剂量，需要进行进一步深入的研究。

参考文献

1

高美须. 植物检疫, 2003, 17(2): 91-94
GAO Meixu. Plant Quar. 2003, 17(2): 91-94

2

陈殿华. 辐射加工, 2008, 1: 5-12
CHEN Dianhua. Radiat Process. 2008, 1:5-12

3

Stevenson M H. Trends Food Sci Tech, 1992, 3: 257-262

4

Boyd D R, Crone A V J, Hamilton J T G. J Agric Food Chem. 1991, 39(4): 789-792

5

Gadgil P, Hachmeister K A, Smith J S, et al. J Agric Food Chem, 2002, 50(20): 5746-5750

6

LeTellier P R, Nawar W W. Lipids, 1972, 7(1): 75-76

7

Stevenson M H, Crone A V J, Hamilton J T G. Nature, 1990, 344(15): 202-203

8

Horvatovich P, Michel M, Hasselmann C, et al. J Chrom A, 2002, 968(1-2): 251-255

9

Gadgil P, Smith J S, Hachmeister K A, Kropf D H. J Agric Food Chem, 2005, 53(6):1890-1893

10

Horvatovich P, Miesch M, Hasselmann C, et al. J Agric Food Chem, 2005, 53(15): 5836-5841

11

Zanardi E, Battaglia A, Ghidini S, et al. J Agric Food Chem, 2007, 55(10): 4264-4270

12

Crone A V J, Hamilton J T G, Stevenson M H. J Sci Food Agric, 1992, 58(2): 249-252

13

Stewart E M, Moore S, Graham W D, et al. J Sci Food Agric, 2000, 80(1): 121-130

14

Kim K S, Lee J M, Seo H Y, et al. Radiat Phys Chem, 2004, 71(1-2): 45-49

15

Stewart E M, McRoberts W C, Hamilton J T G. J Aoac Int, 2001, 84(3): 976-986

16

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

17

Stevenson M H, Crone A V J, Hamilton J T G, et al. Radiat Phys Chem, 1993, 42(1): 363-366

18

Ndiaye B, Jamet G, Miesch M, et al. Marchioni E. Radiat Phys Chem, 1999, 55(4): 437-445

Effects of package style, free radical scavenger and storage time on 2-dodecylcyclobutanone in irradiated beef

ZHANG Haiwei WANG Feng ZHOU Hongjie YIN Qinggang HA Yiming

*(Quality Inspection and Test Center of Irradiated Products, Ministry of Agriculture,
Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)*

ABSTRACT The changing rules of 2-dodecylcyclobutanone according to different package styles and adding free radical scavenger in irradiated beef during storage were investigated. 2-dodecylcyclobutanone was extracted and separated by silica gel column and analyzed by capillary column gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results show that package with preventing from light can induce an appreciable lowering of the concentration of 2-dodecylcyclobutanone formed in irradiated beef, but preventing from oxygen does not have the same effect. The effects of different packaging atmosphere (N_2 , vacuum, and air) on the stability of 2-dodecylcyclobutanone are almost similar during storage. The concentration of 2-dodecylcyclobutanone can be decreased significantly by adding free radical scavengers, and it will be weakened, however, as the storage time extended.

KEYWORDS 2-dodecylcyclobutanone, Free-radical Scavenger, Package style, Irradiated beef, Changing rules

CLC TL99, TS205