**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 86 (1995)

**Heft:** 5

**Artikel:** Le dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le poisson, les produits carnés et le fromage par chromatographie liquide à haute performance = Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish, meat products and cheese using high pe...

**Autor:** Dafflon, Oscar / Gobet, Hansjörg / Koch, Herbert

**DOI:** https://doi.org/10.5169/seals-983645

**Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

**Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

**Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

**Download PDF:** 09.12.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch**

Trav. chim. aliment. hyg. **86**, 534–555 (1995)
Présenté le 31 juillet 1995. Accepté le 4 septembre 1995

# Le dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le poisson, les produits carnés et le fromage par chromatographie liquide à haute performance*

## Quantification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish, Meat products and Cheese using High Performance Liquid Chromatography

*Key words:* Polycyclic aromatic hydrocarbons, HPLC, Fluorescence detection, Fish, Meat products, Cheese

*Oscar Dafflon, Hansjörg Gobet* et *Herbert Koch*
Office vétérinaire fédéral, Liebefeld-Berne

*Jacques Olivier Bosset*
Station fédérale de recherches laitières, Liebefeld-Berne

## Introduction

Bien que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les amines hétérocycliques (AHC) aient été des contaminants des aliments depuis que l'homme a commencé à cuire au feu de bois les produits de sa pêche et de sa chasse, ce n'est pourtant que ces trente dernières années que ces composés ont été mis en évidence et étudiés de façon systématique. Le recours à d'autres modes de cuisson plus modernes et plus ménageants a sensiblement réduit ce risque de contamination des denrées alimentaires. Le rôtissage, le grillage poussé et la cuisson au «barbecue», surtout lorsque les aliments entrent en contact direct avec les flammes, demeurent néanmoins d'importants générateurs de HAP et de AHC. Il en va de même, mais à un moindre degré, lors de cuissons au four, voire avec des modes de cuisson encore plus doux. En outre, certains traitements ancestraux particuliers comme le fumage, longtemps utilisé surtout comme moyen de conservation des aliments, connaissent un regain d'intérêt chez le consommateur en raison de la formation de composés

* Travail présenté sous forme d'un poster le 8 septembre 1995 à Löwenberg/Morat lors de la 107e assemblée annuelle de la Société suisse de chimie alimentaire et environnementale.

typiques de l'arôme des viandes, des produits de charcuterie, des poissons, voire des fromages fumés. Les industriels de la branche répondent d'ailleurs à cette demande avec un éventail assez large de tels produits.

On trouve en général les HAP dans des aliments fumés, des graisses, des huiles, du beurre, de la margarine, du fromage (fumé), du lait en poudre, des plantes, diverses boissons, de l'eau, des produits d'origine marine tels que mollusques et crustacés et dans des fumées liquides, etc. (1–18). Plusieurs facteurs entrent en jeu dans la formation de ces composés, notamment la teneur en matière grasse et en amidon des aliments. La température et la durée de la cuisson ou du chauffage, surtout entre 500 et 700 °C – domaine que l'on rencontre lors de processus usuels de cuisson comme le grillage ou la cuisson au «barbecue» – jouent également un rôle clé.

La contamination des aliments par des HAP peut aussi être le résultat de la pollution de l'environnement (35) qui, par un effet de concentration graduelle dans la chaîne alimentaire, parvient jusqu'à l'homme. On les trouve par exemple dans les retombées atmosphériques des gaz d'échappement des voitures et des chauffages, surtout lors de combustions incomplètes. Ils sont également présents dans les rejets industriels sur le sol et les plantes, dans ceux des raffineries de pétrole ainsi que lors de la pollution répétée des eaux de mer par le dégazage des pétroliers. Etant présents dans les combustibles fossiles avant même leur combustion, les HAP contaminent donc poissons, fruits de mer, crustacés et mollusques. Certains matériaux d'emballage peuvent aussi contribuer à une exposition des aliments aux HAP (1).

Le dosage des HAP dans les matrices biologiques a été décrit par de nombreux auteurs. *Howard* et *Fazio* (2) ont passé en revue les principales méthodes d'analyse publiées jusqu'à 1980. Les essais effectués avec la chromatographie en couche mince (TLC: 3–6, 9) en ont montré les limites car il est difficile d'identifier un grand nombre de HAP avec une telle méthode. La TLC a également été suspectée d'être sujette à plus d'interférences que la chromatographie en phase gazeuse avec colonne capillaire (GC: 7, 19, 20), surtout lorsqu'elle est couplée à une détection par spectrométrie de masse (MS: 6, 11), et que la chromatographie liquide à haute performance avec une détection dans l'UV (HPLC-UV: 8, 21–23) ou par fluorescence (HPLC-FL: 9, 17, 24, 25). Ces deux derniers groupes de méthodes (GC et HPLC) sont d'ailleurs les plus fréquemment cités dans la littérature. D'autres auteurs ont même recouru à la chromatographie supercritique (SFC: 26, 27). Maints travaux ne traitent d'ailleurs que du dosage du seul benzo(a)pyrène.

Pour le présent travail, la méthode par HPLC-FL a été retenue et modifiée en vue de dosages de routine. Les techniques citées dans la littérature nécessitent un «clean-up» inutilement laborieux et compliqué. La méthode a donc été simplifiée, puis appliquée en routine à divers échantillons provenant du commerce.

Plus de 100 composés dérivés du noyau benzénique comportant de 3 à 7 cycles condensés peuvent se former à partir de radicaux libres au cours de réactions de pyrolyse mettant en jeu des glucides, des acides aminés et des lipides (1). Du point de vue toxicologique, parmi les 15 HAP considérés dans le présent travail (tableau 1), le benzo(a)pyrène, qui représente selon les auteurs de 1 à 15% de la masse

*Tableau 1.* Hydrocarbures aromatiques polycycliques étudiés dans le présent travail (ordonnés alphabétiquement d'après leur abréviation)

| Formule et nom du HAP (1) | Abréviation | N° pic | Cancérogénicité (30, 32) | Denrées alimentaires concernées (1) |
|---|---|---|---|---|
| Anthracène | A | 5 | –/? | Steaks grillés au charbon de bois, eau du robinet; produits de la mer |
| Acénaphtène | AP | 2 | –/? | Produits de la mer |
| **Benzo(a)anthracène*** | **BaA** | **8** | **2A / +** | Café torréfié, thé, whisky, eau du robinet, légumes, fruits, viandes et poissons grillés et fumés; huiles et graisses, boissons, céréales, produits fumés (fromage Cheddar, jambon, huîtres); produits de la mer |
| **Benzo(a)pyrène*** | **BaP** | **12** | **2A / +++** | Café torréfié, thé, whisky, végétaux, fruits, margarine, beurre, huile de noix de coco, de tournesol, farine, pain, eau du robinet; viandes, poissons, produits de charcuterie fumés, épices, arômes de fumée, charbon de bois, fruits secs, produits de la mer |
| **Benzo(b)fluoranthène*** | **BbF** | **10** | **2B / +** | Céréales, viandes, poissons, légumes, fruits, boissons; viandes et poissons fumés, huîtres fumées, eau du robinet; produits de la mer |

| Formule et nom du HAP (1) | Abré-viation | N° pic | Cancérogéni-cité (30, 32) | Denrées alimentaires concernées (1) |
|---|---|---|---|---|
| **Benzo(g,h,i)pérylène*** | **BghiP** | **14** | **3 / –(++)** | Steaks grillés au charbon de bois, eau du robinet; céréales, viandes, poissons, légumes, fruits, boissons; produits fumés (fromage Cheddar, jambon, saucisses, huîtres, poissons); produits de la mer |
| Benzo(k)fluoranthène | BkF | 11 | 2B / –(+/–) | Céréales, viandes, poissons, végétaux, fruits, boissons; eau du robinet; produits de la mer |
| Chrysène | Ch | 9 | 3 / ? | Café torréfié, thés, whisky, végétaux, céréales, huile de noix de coco, viandes, saucisses, poissons |
| **Dibenzo(ah)anthracène*** | **DBahA** | **13** | **2A / +++** | Produits de la mer |

| Formule et nom du HAP (1) | Abré-viation | N° pic | Cancérogéni-cité (30, 32) | Denrées alimentaires concernées (1) |
|---|---|---|---|---|
| Fluoranthène | F | 6 | 3 / – | Steaks grillés au charbon de bois, eau du robinet; produits fumés (poulet, produits de charcuterie, huîtres, poissons); produits de la mer |
| Fluorène | Fl | 3 | ? / ? | Eau du robinet |
| **Indéno(1,2,3-c,d)pyrène*** | **IcdPy** | **15** | **2B / +** | Eau du robinet, produits fumés (fromage Cheddar, jambon, saucisses, huîtres, poissons); produits de la mer |
| Naphtalène | N | 1 | ? / ? | (Peu recherché, peu étudié, pas d'informations disponibles) |
| Phénanthrène | Phen | 4 | ? / ? | Steaks grillés au charbon de bois, eau du robinet |

| Formule et nom du HAP (1) | Abré-viation | N° pic | Cancérogéni-cité (30, 32) | Denrées alimentaires concernées (1) |
|---|---|---|---|---|
| Pyrène | Py | 7 | 3 / – | Steaks grillés au charbon de bois; produits de la mer |

* Les composés indiqués avec un astérisque sont particulièrement toxiques.
L'échelle de toxicité est la suivante:

2A = probablement cancérogène chez l'homme (30)
2B = pourrait être cancérogène chez l'homme (30)
3 = n'est pas cancérogène chez l'homme (30)
? = pas d'information disponible (30)
+++ = très cancérogène (32)
++ = cancérogène (32)
+ = quelque peu cancérogène (32)
+/– = non cancérogène (32)
? = pas d'information disponible (32)

totale des HAP, a indéniablement été le plus souvent recherché et étudié en raison de ses propriétés cancérogènes. Il a même été utilisé historiquement comme référence pour mesurer le caractère cancérogène des autres HAP (28).

Selon l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC: 19, 29) et l'Institut de toxicologie de l'Ecole polytechnique fédérale et de l'Université de Zurich (30), on considère actuellement comme les plus toxiques dans les denrées alimentaires ou dans l'air, les 5 HAP suivants: le benzo(a)anthracène (BaA), le benzo(a)pyrène (BaP), le benzo(b)fluoranthène (BbF), le dibenzo(ah)anthracène (DBahA) et l'indéno(1,2,3-c,d)pyrène (IcdPy). Ces composés sont indiqués avec un astérisque dans le tableau 1.

## Partie expérimentale

### *Principe de l'analyse*

La méthode proposée recourt à une saponification des graisses avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, suivie d'une extraction des HAP avec du cyclohexane. Le «clean-up» s'effectue sur une cartouche à phase stationnaire solide (SPE: 8, 22). On peut alors séparer chromatographiquement les différents HAP à l'aide d'une colonne à phase inverse (RP-HPLC) et d'une élution à gradient. La détection est opérée avec un détecteur de fluorescence à longueur d'onde variable programmée. La limite de détection mesurée (rapport signal/bruit de fond = 3) est de 0,1 ng/ml ou 1,0 pg en quantité absolue (volume injecté: 10 µl) pour une solution mixte de standards. La limite de détection est de 1,0 µg/kg en présence d'une matrice de type poisson ou produit carné et de 0,1 µg/kg dans une matrice de type fromage.

### *Réactifs*

Cyclohexane Lichrosolv (Merck art. no 1.02827)
Acétonitrile Lichrosolv (Merck art. no 30)
Ethanol Lichrosolv (Merck art. no 11727)
Sulfate de sodium p.A. (J.T. Baker, 12–60 mesh, art. no 3375)
Solution éthanolique d'hydroxyde de potassium 1,0 mol/l (Suprapur Merck art. no 2827)
Solution mixte de standards HAP dans l'acétonitrile (10 ng de chaque HAP/µl) (Dr. Ehrenstorfer, Bgm. Schlosserstr. 6a, D-86199 Augsburg, art. no L209509)
Solution mixte de calibrage diluée à 25 µg/l dans l'acétonitrile
Cartouche «Solide Phase Extraction» (SPE) ODS, 6 ml, 1000 mg (J & W art. no 1881360)
Eau bidistillée ou de qualité équivalente (par ex. Milli-Q)
Azote pureté 57 (Carbagas, CH-3097 Liebefeld-Berne) pour sécher les extraits HAP sous atmosphère inerte.
Hélium pureté 60 (Carbagas, CH-3097 Liebefeld-Berne) pour dégazer l'éluant.

### *Choix et provenance des échantillons*

Les poissons tant d'eau douce ($n$ = 45) que d'eau de mer ($n$ = 74), les crustacés ($n$ = 28), les mollusques ($n$ = 9), les produits de salaison ($n$ = 7), la charcuterie échaudée (n = 9) et crue (n = 28), les fromages fabriqués dans des chaudières chauffées à la vapeur ($n$ = 10 de plaine + n = 2 de montagne) de même que ceux fabriqués sur feu de bois ouvert ($n$ = 8 de divers alpages) proviennent de commerces locaux.

### *Appareillage*

Appareil HPLC type H.P. 1081B (Hewlett-Packard)
Détecteur de fluorescence type 1080 à longueur d'onde programmable (Merck-Hitachi)
Intégrateur type H.P. 3396 Series III (Hewlett-Packard)
Thermostat type Pelcooler pour la colonne de séparation (Prolab Instruments Co, CH-4153 Reinach)
Bain-marie secouant type SBK25 (Salvis)
Centrifuge type Hettich-Rotanta type D72, tête de centrifuge diamètre 12 cm
Evaporateur rotatif, équipé d'un contrôleur de vide type 168 (Büchi, CH-9230 Flawil).

### *Mode opératoire*

#### *Traitement de l'échantillon*

Dans un verre à centrifuger de 100 ml équipé d'un rodage et d'un réfrigérant, introduire env. 2,0 g (si < 20 g de graisse/kg) ou env. 1,0 g (si > 20 g de graisse/kg) d'échantillon finement homogénéisé (tel quel, sans ajout d'eau), pesé à 1 mg près. Ajouter 10,00 ml de la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium. Pour la saponification, chauffer pendant 3 h dans un bain-marie secouant à 80 °C. Laisser refroidir à température ambiante. Ajouter 10,00 ml d'eau et 20,00 ml de cyclohexane. Agiter alors vigoureusement pendant 5 min à l'aide d'un mélangeur mécanique à l'abri de la lumière. Centrifuger pendant 3 min à 4000 tours/min. Décanter la phase surnageante et répéter l'extraction avec 20,00 ml de cyclohexane. Réunir les extraits, les sécher avec env. 3 g de sulfate de sodium et réduire leur volume à env. 1,0 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif sous 200 mbar et à 40 °C (température du bain-marie). Evaporer le résidu à sec sous azote et à température ambiante, le reprendre 2 fois de suite dans env. 1,0 ml d'acétonitrile et le porter sur une cartouche SPE préalablement conditionnée et lavée avec 5,0 ml d'acétonitrile. Eluer alors les HAP avec 2 fois 3,0 ml d'acétonitrile et les évaporer à sec dans les mêmes conditions que précédemment. Reprendre les HAP ainsi purifiés dans 1,00 ml d'acétonitrile et les injecter immédiatement (10 µl d'extrait) sur la colonne de séparation. Toutes ces opérations doivent être effectuées à l'abri de la lumière.

*Conditions chromatographiques:*

Précolonne type LiChrospher 100 RP-18, 4 x 4 mm, 5 µm (Merck art. no 50957.0001)
Colonne RP-HPLC type LiChrospher PAH, 5 µm 250 x 3 mm (Merck art. no 1.50156)
Phase mobile: mélange d'acétonitrile et d'eau dans les proportions indiquées dans le tableau 2.

*Tableau 2.* Programme d'élution utilisé pour séparer les HAP par RP-HPLC

| Temps (min) | Acétonitrile (vol/vol %) | Eau (vol/vol %) | Type de séparation |
|---|---|---|---|
| 3 | 60 | 40 | isocratique |
| 15 | 60 → 100 | 40 → 0 | gradient |
| 19 | 100 | 0 | isocratique |

Débit de l'élution: 0,56 ml/min
Température de la colonne: 19 °C (thermostatée)
Volume injecté: 10 µl
Durée de la chromatographie: 37 min
Le tableau 3 indique les longueurs d'onde du détecteur de fluorescence.

*Tableau 3.* Programmation des longueurs d'onde du détecteur de fluorescence

| HAP analysés* | N AP Fl | Phen | A | F | Py | BaA Ch | BbF BkF BaP | DBahA BghiP | IcdPy |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| λ excitation (nm) | 280 | 246 | 250 | 280 | 270 | 265 | 290 | 290 | 300 |
| λ émission (nm) | 330 | 370 | 406 | 450 | 390 | 380 | 430 | 410 | 500 |

* Cf. abréviations dans le tableau 1.

## Résultats et discussion

### *Améliorations et simplifications apportées au dosage des HAP*

Le présent travail propose trois améliorations et simplifications notoires des méthodes usuellement citées dans la littérature quant aux étapes d'extraction, de «clean-up» et de séparation chromatographique des HAP.

*L'extraction*

La méthode proposée ne nécessite que de 1 à 2 g d'échantillon au lieu des 20 à 30 g indiqués généralement dans la littérature. Elle permet ainsi une sensible économie de solvants, donc une réduction des coûts et de la charge de l'environnement. Elle diminue donc dans la même proportion le risque de contamination des échantillons par les impuretés contenues dans les solvants lors de la phase d'extraction et de concentration du résidu. Ce mode opératoire permet enfin d'effectuer la saponification et l'extraction dans un seul et même récipient, ce qui facilite grandement le travail.

*Le clean up*

Le clean up s'effectue sur une cartouche SPE avec de l'acétonitrile comme solvant et comme éluant: 6,0 ml suffisent à éluer les HAP. Ce mode de traitement, très simple et peu coûteux, prévient en outre tout effet de matrice et toute interférence. Il permet de ménager la colonne de séparation qui, après plusieurs centaines d'injections, ne présente aucune perte de son pouvoir de résolution.

*La colonne de séparation*

La séparation proprement dite des HAP a été optimisée. Un diamètre intérieur de 3 mm est préférable à un diamètre intérieur de 4 mm pour la colonne de séparation. Il permet en effet de réduire le débit d'élution de 1,00 à 0,56 ml/min tout en gardant la même vitesse d'écoulement dans la colonne (quotient du carré des rayons). On peut alors diminuer de 20 à 10 µl le volume d'injection. Dans ces conditions, l'expérience a montré que la sensibilité de la méthode a pratiquement doublé et que la résolution des pics a été sensiblement améliorée en raison d'une plus faible diffusion radiale. Dans le cas d'échantillons positifs, il est néanmoins recommandé de confirmer la présence des HAP détectés en répétant l'analyse après ajout du standard mixte dilué.

*Calibrage*

Le calibrage a été effectué à l'aide de la «solution mixte de calibrage» diluée (contenant 25 µg/l de chacun des HAP dans l'acétonitrile). La linéarité de la réponse du détecteur a été vérifiée pour des concentrations usuelles comprises entre 0,5 et 50 µg/l.

A titre d'exemple, la figure 1A présente le chromatogramme d'un échantillon témoin (blanc), la figure 1B, celui d'un échantillon de poisson exempt de HAP (échantillon négatif), la figure 1C, celui d'un échantillon de poisson fumé contenant des HAP (échantillon positif). La figure 1D montre enfin le chromatogramme de la «solution mixte de calibrage» diluée.

*Taux de récupération*

Le taux de récupération a été déterminé par un ajout unique direct de 25 µl de la «solution mixte de calibrage» diluée (à 1 mg/l de chacun des HAP) dans 1 g

d'échantillon de poisson exempt de HAP (comme matrice). Les résultats sont résumés dans le tableau 4.

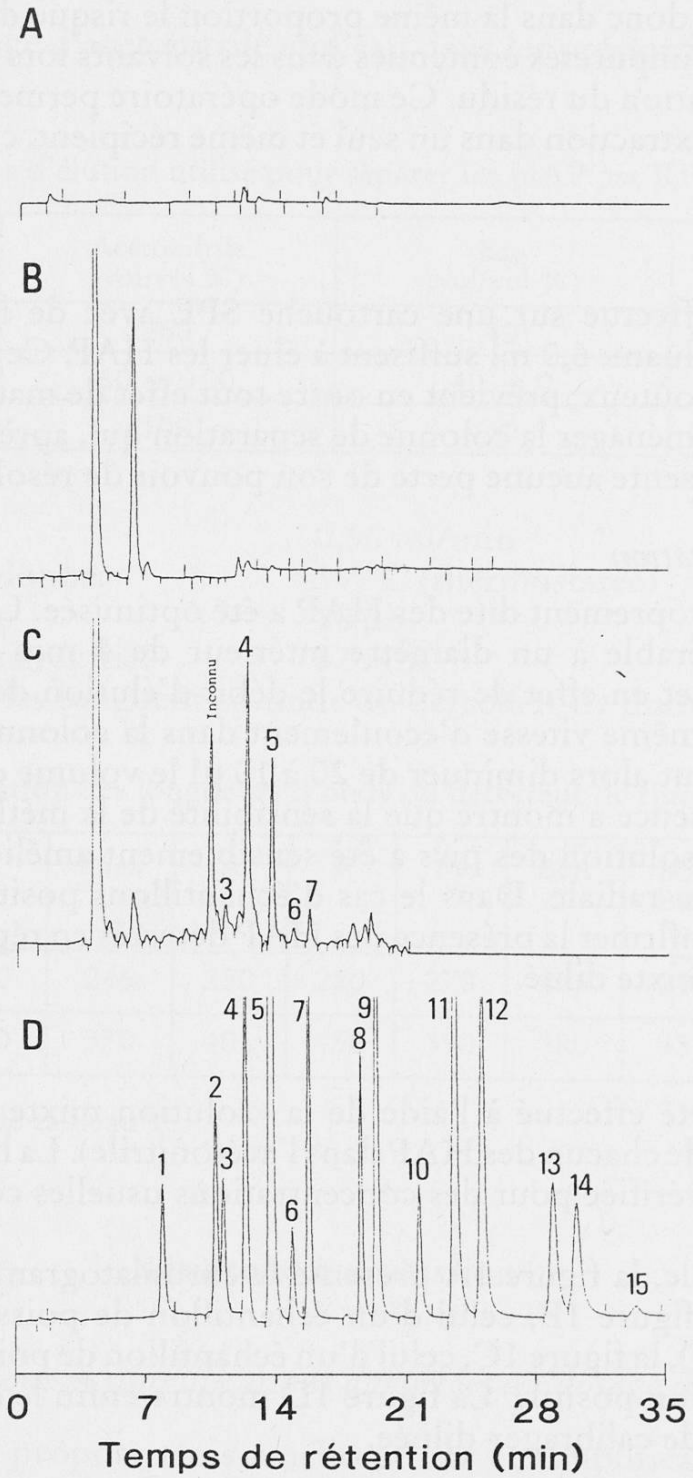


*Fig. 1.* Chromatogrammes de RP-HPLC d'échantillons: A) témoin (blanc); B) négatif (poisson exempt de HAP); C) positif (poisson contenant des HAP) et D) de référence (solution mixte de calibrage diluée).
*Légende:* cf. liste de pics identifiés dans le tableau 1

*Tableau 4.* Taux de récupération mesurés pour les 15 HAP ajoutés sous la forme d'un ajout unique direct de la «solution mixte de calibrage» à un échantillon de poisson (matrice) exempt de HAP

| HAP ajouté* (à 25 µg/kg) | $\bar{x}$ (µg/kg trouvé) | $s_r$ (µg/kg trouvé) | $cv_r$ (%) | Taux (en %) de récupération |
|---|---|---|---|---|
| A | 22,8 | 3,0 | 13,1 | 91,2 |
| AP | 18,6 | 1,3 | 6,9 | 74,4 |
| BaA | 23,5 | 3,4 | 14,5 | 94,0 |
| BaP | 21,2 | 4,6 | 21,7 | 84,8 |
| BbF | 21,5 | 7,4 | 34,4 | 86,0 |
| BghiP | 16,0 | 5,7 | 35,6 | 64,0 |
| BkF | 21,2 | 8,1 | 38,2 | 84,8 |
| Ch | 23,1 | 3,5 | 15,1 | 92,4 |
| DBahA | 23,5 | 7,2 | 30,5 | 94,0 |
| F | 24,3 | 3,9 | 16,0 | 97,2 |
| Fl | 21,0 | 2,8 | 13,3 | 84,0 |
| IcdPy | 17,1 | 3,1 | 18,2 | 68,4 |
| N | 15,1 | 1,1 | 7,6 | 60,4 |
| Phen | 25,4 | 2,1 | 8,3 | 101,6 |
| Py | 24,9 | 5,6 | 22,5 | 99,6 |

* Cf. abréviations dans le tableau 1
$\bar{x}$ = moyenne arithmétique de $n = 3$ déterminations
$s_r$ = écart-type de 3 déterminations
$cv_r$ (%) = coefficient de variation
Taux (en %) de récupération en pour-cent de l'ajout

*Répétabilité*

La répétabilité des déterminations des standards varie de 7 à 40% (tableau 4).

*Application de la méthode proposée à divers échantillons provenant du commerce*

Le tableau 5 résume les résultats des analyses de HAP effectuées d'octobre 1994 à février 1995 (rapport d'examen) sur des poissons d'eau douce et de mer, des crustacés, des mollusques et des produits carnés fumés (soit de la charcuterie échaudée et crue) provenant du commerce.

On trouve les teneurs les plus élevées dans les poissons fumés ainsi que dans la charcuterie crue, ce qui indique clairement que ces composés sont dus au fumage. Les HAP les plus fréquemment identifiés sont le naphtalène (N), l'acénaphtène (AP), le fluorène (Fl), le phénanthrène (Phen), l'anthracène (A), le fluoranthène (F) et le pyrène (Py). On remarque d'ailleurs une distribution différente des teneurs en ces HAP entre les poissons d'eau douce et les poissons de mer fumés. Ces différences peuvent fort bien s'expliquer par des différences dans les techniques de fumage:

*Tableau 5.* Teneurs en HAP des échantillons analysés par RP-HPLC

| HAP* | Teneur | Poissons fumés | | Crustacés | Mollus-ques | Produits salaison crus | Charcuterie | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | eau douce | de mer | | | | échaudée | crue |
| | µg/kg | $n = 45$ | $n = 74$ | $n = 28$ | $n = 9$ | $n = 7$ | $n = 9$ | $n = 28$ |
| A | 1–10 | 23 | 27 | 1 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| | >10 | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AP | 1–10 | 3 | 6 | 0 | 1 | 0 | 0 | 10 |
| | >10 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| BaA | 1–10 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| BaP | 1–10 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BbF | 1–10 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BghiP | 1–10 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| BkF | 1–10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ch | 1–10 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| | >10 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DBaHA | 1–10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| F | 1–10 | 13 | 30 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 |
| | >10 | 2 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Fl | 1–10 | 25 | 31 | 3 | 1 | 0 | 0 | 8 |
| | >10 | 4 | 25 | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| IcdPy | 1–10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | >10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| N | 1–10 | 6 | 9 | 4 | 2 | 0 | 4 | 14 |
| | >10 | 2 | 12 | 1 | 0 | 0 | 2 | 12 |
| Phen | 1–10 | 34 | 32 | 19 | 6 | 2 | 2 | 13 |
| | >10 | 9 | 34 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| Py | 1–10 | 12 | 33 | 7 | 5 | 1 | 2 | 9 |
| | >10 | 1 | 6 | 3 | 1 | 0 | 1 | 3 |

* Cf. abréviations dans le tableau 1

espèces de bois utilisées, géométrie des fumoirs, durée et température du fumage, etc.

Du point de vue toxicologique, on ne rencontre que rarement les HAP les plus dangereux soit le BaA (7x), le BaP (2x), le BbF (1x), et, à 5 exceptions près,

uniquement dans des produits d'origine marine. Ces 5 exceptions – dont 2 dépassent la concentration de 10 µg/kg – sont dues dans 3 cas au BaA trouvé dans de la charcuterie crue et dans 2 cas à des poissons d'eau douce fumés (Tableau 5). Le BaP a également été mis en évidence dans 2 cas (un poisson de mer fumé et un mollusque). Ce composé a aussi été trouvé dans certaines saucisses fumées (31).

En raison de problèmes de nature analytique, l'évaluation de la contamination des denrées alimentaires en HAP s'est souvent limitée au dosage du seul B(a)P, qui de plus est reconnu comme l'un des plus dangereux HAP. La réglementation française actuellement en vigueur a fixé à 1 µg/kg la limite maximale admissible en B(a)P des viandes et des produits de charcuterie (1). La plupart des pays de l'Union européenne ont également adopté cette limite, certains pays, comme l'Allemagne, l'étendant à d'autres produits tels que les poissons et des fromages fumés (5). En l'absence de législation, il semble raisonnable de se fixer cette limite, d'autant qu'elle est au-dessus du seuil de détection de la plupart des méthodes de dosage modernes comme la HPLC-FL (1) tout en permettant de garantir une bonne résolution chromatographique. Dans une étude récente sur des produits alimentaires fumés, *Moll* (1) a trouvé 20% des saumons (de < 0,1 à 7,9 µg/kg; $n = 35$), 27% d'autres espèces de poissons (de < 0,2 à 1,9 µg/kg; $n = 18$), 42% de produits volaillers (de 0,3 à 1,9 µg/kg; $n = 14$) et 38% de produits de charcuterie (de < 0,1 à 7,2 µg/kg; $n = 74$) analysés dépassant cette limite. Cet auteur indique néanmoins que le B(a)P est très photosensible, ce qui permet d'expliquer la diminution en surface de cette substance à côté du phénomène strictement physique de sa diffusion de l'extérieur vers l'intérieur de la denrée alimentaire. On pourrait donc être confronté à la situation quelque peu paradoxale d'un produit fraîchement fumé qui ne soit pas conforme à la législation juste après la fabrication mais qui le devienne en cours de stockage jusqu'à la limite de péremption. En ce qui concerne les produits de charcuterie, d'autres facteurs entrent en jeu tels que la teneur en eau, celle en matière grasse et surtout la durée de la cuisson qui permet d'abaisser la teneur en B(a)P dans certains types de saucisses par exemple (31).

L'utilisation de fumées liquides (32) (obtenues par barbotage de fumées dans de l'eau), moins riches en B(a)P semble-t-il, pourrait progressivement remplacer, dans certains cas du moins, les fumages au bois qui sont réalisés soit à l'aide de générateurs de fumée modernes, soit dans des cheminées conçues à cet effet (fumage artisanal à l'ancienne, où les denrées à fumer sont placées directement au-dessus des braises pendant plusieurs jours consécutifs). En France, la fumée liquide (obtenue à partir de combustion de bois de noyer) ne doit pas contenir plus de 5 µg/kg de B(a)P. Une directive de l'Union européenne fixe une limite de 0,03 µg/kg de B(a)P dans les denrées alimentaires consommées telles quelles lorsque cet apport est dû exclusivement à l'utilisation d'arôme (1).

La méthode proposée a également été appliquée à 20 fromages de type Gruyère ou Etivaz: 8 ont été fabriqués sur des alpages dans des chaudières chauffées sur feu de bois ouvert et 12 ont été fabriqués dans des cuves chauffées à la vapeur (10 en plaine et 2 sur des alpages). Les tableaux 6 et 7 montrent clairement la présence de 4 HAP dus à la fumée du premier mode de chauffage.

A titre d'exemple, la figure 2A montre le chromatogramme obtenu avec l'un des fromages de plaine (foyer fermé) comme référence, exempt de HAP. La figure 2B indique la présence dans l'un des fromages d'alpage (foyer ouvert) de 4 HAP dont la concentration dépasse la limite de détection (ici 0,1 µg/kg). Il s'agit du phénanthrène, de l'anthracène, du fluoranthène et du pyrène. La figure 2C montre le chromatogramme du même échantillon (fromage d'alpage) après l'ajout de la «solution mixte de calibrage» contenant 25 µg/l de 15 divers HAP afin de confirmer les temps de rétention des composés identifiés.

Les 4 HAP identifiés dans les échantillons de fromages d'alpages fabriqués sur feu de bois ouvert n'appartiennent pas au groupe des substances particulièrement toxiques (indiquées avec un astérisque dans le tableau 1). En outre, ces HAP sont présents en concentrations extrêmement faibles, inférieures à 3 µg/kg. Du point de vue toxicologique, d'autres auteurs ont d'ailleurs confirmé l'absence de composés

*Tableau 6.* Teneur en HAP de fromages d'alpages fabriqués sur feu de bois ouvert (cf. aussi * et **)

| Alpage | phénanthrène | anthracène | fluoranthène | pyrène |
|---|---|---|---|---|
| | (µg/kg) | (µg/kg) | (µg/kg) | (µg/kg) |
| A | 2,1 | 0,5 | 0,8 | 0,6 |
| B | 2,6 | 0,5 | 0,5 | 0,4 |
| C* | 0,6 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,2 |
| D | 2,8 | 0,6 | 0,8 | 0,7 |
| E | 2,0 | 0,5 | ≤0,1 | 0,3 |
| F | 1,9 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| G | 2,9 | 0,6 | 0,7 | 0,6 |
| H** | 0,9 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,2 |
| Moyenne | 1,98 | 0,43 | 0,45 | 0,44 |
| Médiane | 2,05 | 0,50 | 0,50 | 0,45 |
| Ecart-type | 0,84 | 0,21 | 0,31 | 0,19 |
| Interquart. inf. | 1,65 | 0,4 | ≤0,1 | 0,275 |
| Interquart. sup. | 2,65 | 0,525 | 0,725 | 0,6 |
| Coeff. var. (%) | 43 | 48 | 69 | 44 |
| Minimum | 0,6 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,2 |
| Maximum | 2,9 | 0,6 | 0,8 | 0,7 |

* Alpage de la région de l'Etivaz disposant d'un système de ventilation très efficace (sans odeur de fumée).

** Alpage du jura vaudois présentant un système de séparation efficace du lait et de la fumée, tant lors du stockage que du chauffage du lait (pas d'odeur de fumée).

La limite de détection est de 0,1 µg/kg dans le fromage.

*Tableau 7.* Teneur en HAP de divers fromages fabriqués sur foyer fermé

| Fromagerie | phénanthrène | anthracène | fluoranthène | pyrène |
|---|---|---|---|---|
| | (µg/kg) | (µg/kg) | (µg/kg) | (µg/kg) |
| I* | 0,6 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| J* | 0,7 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| K | 0,7 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| L | 1,0 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,3 |
| M | 1,2 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,3 |
| N | 1,1 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,3 |
| O | 1,0 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,2 |
| P | 0,6 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,2 |
| Q | 0,8 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| R | 0,8 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,2 |
| S | 0,9 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,3 |
| T | 0,5 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| Moyenne | 0,83 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,19 |
| Médiane | 0,80 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,20 |
| Ecart-type | 0,22 | – | – | 0,09 |
| Interquart. inf. | 0,675 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| Interquart. sup. | 1,0 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,3 |
| Coeff. var. (%) | 26 | – | – | 47 |
| Minimum | 0,5 | ≤0,1 | ≤0,1 | ≤0,1 |
| Maximum | 1,2 | ≤0,1 | ≤0,1 | 0,3 |

* Fromage d'alpage fabriqué dans chaudière à vapeur.
La limite de détection est de 0,1 µg/kg dans le fromage.

cancérogènes tel que le benzo(a)pyrène dans les fromages fumés de type «Swiss Cheese» et Cheddar (13).

A côté d'autres composés volatils (terpéniques notamment) (33) provenant semble-t-il de la flore alpine pâturée par les vaches, la présence de traces de phénanthrène et surtout d'anthracène, de fluoranthène et de pyrène dans les fromages d'alpages est donc un critère important qui permet de distinguer une production sur foyer ouvert, au feu de bois, d'une production sur foyer fermé, en général dans une chaudière chauffée à la vapeur. Les HAP pourraient donc être des «marqueurs» de fromages d'alpages particulièrement intéressants du point de vue des appellations d'origines contrôlée (A.O.C.) ou protégée (A.O.P.). Afin de compléter ces premiers résultats, une cinquantaine d'autres fromages (soit 25 env. en provenance d'alpages et 25 env. en provenance de plaine) feront l'objet d'une étude systématique pendant une période d'estivage complète (de mai à octobre 1995). Un autre essai indépendant sera encore effectué avec 6 fromages: 3 seront

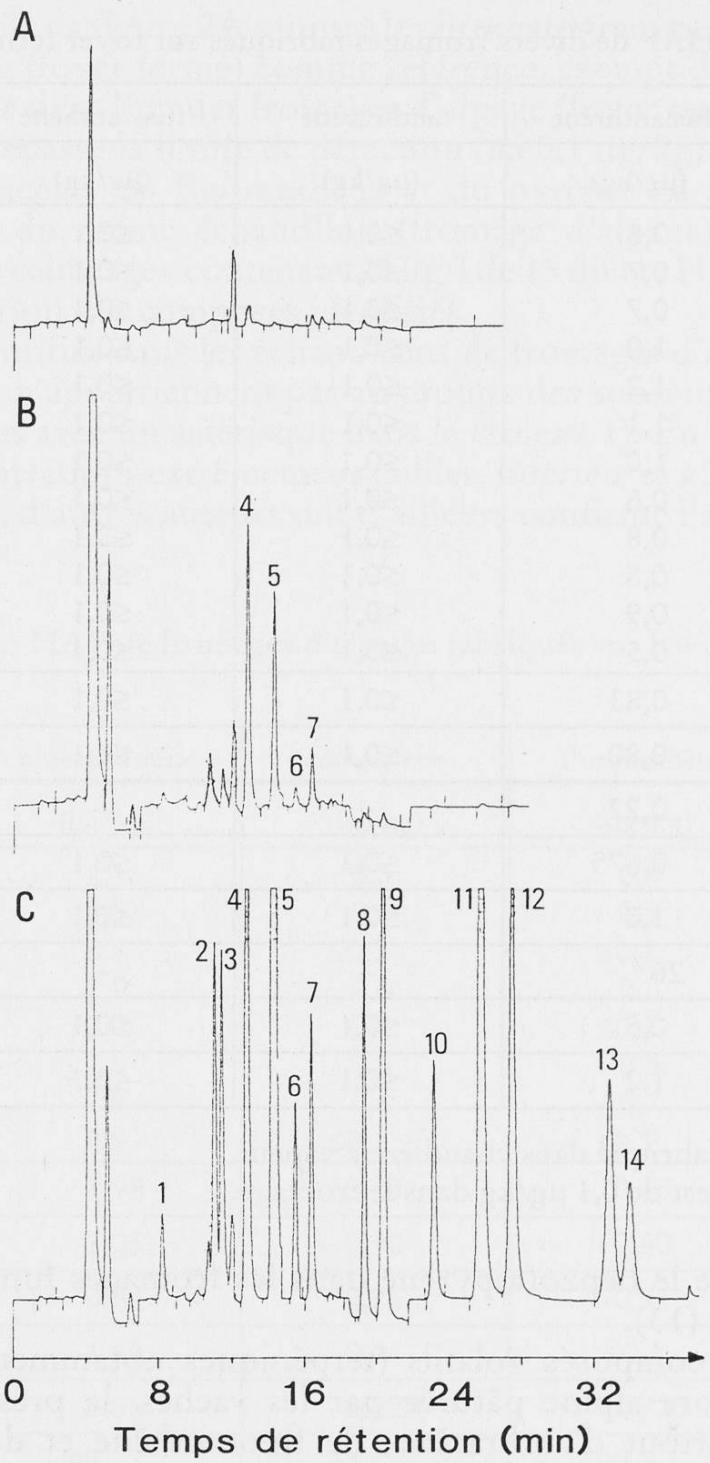


*Fig. 2.* Chromatogrammes de RP-HPLC: A) d'un fromage fabriqué sur foyer fermé (chauffage à la vapeur), B) d'un fromage fabriqué sur foyer ouvert, au feu de bois et C) du même fromage après «spiking» avec la solution mixte de calibrage diluée)
*Légende:* cf. liste des pics identifiés dans le tableau 1

fabriqués sur feu de bois ouvert et 3 le seront au gaz, les autres conditions de fabrication demeurant les mêmes (lait, cultures, affinage, etc.). La différence permettra donc de vérifier l'influence du seul paramètre technologique «fumée» lors du chauffage du lait sur feu de bois ouvert.

## Conclusion

Le présent travail propose quelques simplifications et améliorations notoires apportées aux méthodes de dosage des HAP les plus récemment décrites dans la littérature, tout particulièrement en ce qui concerne les quantités d'échantillons nécessaires à l'analyse. Cette réduction de la taille des échantillons permet à son tour une diminution des volumes de solvants et d'éluants utilisés. Outre leurs avantages économiques et écologiques, ces réductions de réactifs et un recours à un «clean up» sur cartouche de type SPE (ODS) se traduisent par une moindre contamination des extraits lors de leurs étapes de concentration successives, ainsi que par l'emploi d'une colonne chromatographique de diamètre intérieur plus faible (3 au lieu de 4 mm). Ces diverses mesures conduisent en définitive à une amélioration de la sensibilité et de la limite de détection de la méthode proposée ainsi qu'à une amélioration de la qualité de la résolution chromatographique (moins de diffusion radiale dans la colonne de séparation). Enfin, on peut noter l'absence d'effets de matrice et d'interférences avec des matrices aussi complexes et diverses que des poissons, des produits carnés et des fromages à teneur élevée en matière grasse. Un soin tout particulier est néanmoins requis quant à la pureté des solvants utilisés, condition sine qua non pour atteindre une limite de détection de 0,1 ng/ml ou de 1,0 pg en quantité absolue (pour volume injecté de 10 µml et pour un rapport signal/bruit de fond égal à 3). Plusieurs centaines d'injections sur la même colonne de séparation n'ont pas entraîné la moindre diminution de son pouvoir de séparation, ce qui démontre l'extrême propreté des extraits obtenus. Les taux d'extraction sont compris entre 80 et 100%, sauf pour le naphtalène, l'acétonaphtène, le benzo(g,h,i)pérylène et l'indéno(1,2,3-c,d)pyrène, pour lesquels les taux d'extraction oscillent entre 60 et 80%. La répétabilité des dosages varie de 7 à 40% relatifs selon les composés dans les matrices considérées dans le cadre de ce travail.

L'application de cette méthode en routine à un grand nombre d'échantillons de poissons, de crustacés, de mollusques, de produits carnés de type charcuterie et de fromages, tant d'alpage que de plaine, a démontré la double origine de leurs HAP: la première est liée aux technologies de fabrication et de production, essentiellement au fumage. C'est particulièrement le cas des poissons d'eau douce et de mer fumés, des produits carnés de type charcuterie et des fromages d'alpages. On y trouve surtout du naphtalène, du fluorène, du phénanthrène, de l'anthracène, du fluoranthène et du pyrène, faiblement toxiques. Dans le cas des fromages, on n'a identifié aucun HAP à risque, et ceux mis en évidence (phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène) étaient présents en teneurs toujours inférieures à 3 µg/kg. L'autre origine des HAP est vraisemblablement à rechercher dans la contamination des denrées alimentaires par l'environnement, comme l'indiquent maints auteurs (34, 35). Les HAP les plus dangereux comme le benzo(a)anthracène, le benzo(b)fluoranthène, le benzo(a)pyrène, le dibenzo(ah)anthracène et l'indéno(1,2,3-c,d)pyrène, ainsi qu'à un moindre degré le benzo(k)fluoranthène et le benzo(g,h,i)pérylène ne se rencontrent heureusement que rarement, et généralement en concentrations inférieures à 10 µg/kg.

## *Remerciements*

Les auteurs remercient leurs collègues pour leur lecture critique du manuscrit, en particulier le Dr *R. Sieber*, ainsi que pour l'aimable mise à disposition de ses références bibliographiques sur ce sujet. Ces remerciements s'adressent aussi à M. *R. Gauch* pour sa collaboration précieuse à la préparation des tableaux et des figures, de même qu'à M. *J.-L. Menoud* de la maison Mifroma à Ursy et M. *B. Gaudard* à l'Etivaz pour l'envoi d'échantillons de fromages de plaine et d'alpages.

## *Résumé*

Le présent travail propose un certain nombre d'améliorations et de simplifications au dosage par RP-HPLC des hydrocarbures aromatiques polycycliques de diverses denrées alimentaires, surtout en ce qui concerne la taille et le «clean-up» des échantillons, les volumes de solvants et d'éluants nécessaires ainsi que le choix du diamètre intérieur de la colonne de séparation. La détection est spectrofluorométrique à longueurs d'onde d'excitation et d'émission programmées. Les diverses modifications proposées permettent non seulement des économies de réactifs, mais permettent encore d'améliorer les limites de détection et une amélioration de la résolution chromatographique de ces composés. A 4 exceptions près, les taux de récupération déterminés par ajouts connus («spiking» des échantillons) sont supérieurs à 80%. La répétabilité varie de 7 à 40% relatifs. La limite de détection dans des matrices de type poissons, crustacés, mollusques et produits carnés (charcuterie) est de l'ordre de 1 µg/kg. Elle est approximativement 10 fois plus basse (0,1 µg/kg) pour une matrice de type fromage. L'application en routine de cette méthode, simple et rapide, à un grand nombre de denrées alimentaires provenant du commerce a montré que le fumage est l'une des principales sources de HAP (avant cuisson), l'autre origine étant probablement une contamination par l'environnement. Les HAP les plus dangereux (cancérogènes) ne se rencontrent que très rarement et généralement en teneurs inférieures à 10 µg/kg.

## *Zusammenfassung*

In der vorliegenden Arbeit werden einige Verbesserungen und Vereinfachungen zur Bestimmung der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) mittels RP-HPLC in Lebensmitteln beschrieben. Dies betrifft vor allem die reduzierte Probenmenge, die Aufarbeitung, die Lösungsmittel- und Fliessmittelvolumina und die Wahl des Innendurchmessers der Trennsäule. Diese Modifikationen ergeben eine Verbesserung der Nachweisgrenze und der chromatographischen Auftrennung der einzelnen PAK. Mit Ausnahme von 4 Komponenten liegt die Wiederfindungsrate (dotierte Proben) bei über 80%, die Reproduzierbarkeit bei 7–40% und die Nachweisgrenze bei 1 µg/kg (bei Fleischprodukten, Fisch usw.) oder tiefer (0,1 µg/kg bei Käse). Die Anwendung dieser Routinemethode ist einfach, schnell und hat gezeigt, dass die PAK von geräucherten Lebensmitteln oder aus der Umwelt stammen. Die für die Gesundheit gefährlichsten PAK (kanzerogene Eigenschaften) werden selten gefunden und auch hier liegen die Werte unter 10 µg/kg.

## *Summary*

An improvement and simplification of the RP-HPLC method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon residues in various foods is described. The modification concerns the size and the clean up of the sample, the volumes of solvents and eluents as well as the choice of the inner diameter of the column. The detection is performed using fluorescence spectroscopy with a variable wavelength detector. The proposed modification uses less reagent and improves the detection limit as well as chromatographic resolution. The recovery determined by spiking samples is greater than 80% for all but 4 components. The repeatability is contained between 7–40%. The detection limit is 1 µg/kg for meat products, fish etc. or lower (0.1 µg/kg for cheese). The use of this method in a routine analysis of a large number of commercial foods showed that smoking is one of the principal sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in fish and meat products. Another possible source of contamination is the environment. The most dangerous PAH for health (carcinogens) are found only very rarely and generally at a concentration below 10 µg/kg.


## *Bibliographie*


1. *Moll, N.:* Evaluation de la contamination des aliments et des boissons par les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines hétérocycliques. Dans: *Moll, M.* et *Moll, N.* (coordonnateurs), Sécurité alimentaire du consommateur, 265–284. Technique & Documentation – Lavoisier, Paris 1995.
2. *Howard, J.W.* and *Fazio, T.:* Review of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods – Analytical methodology and reported findings of polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **63,** 1077–1104 (1980).
3. *Fazio, T.:* Polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo(a)pyrene in food – Spectrophotometric method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **73,** 1176–1178 (1990).
4. *von Stoyke, M.* und *Müller, L.:* Screening Test zur Analytik von Benzo(a)pyren in tierischen Fetten. Arch. Lebensmittelhyg. **41,** 77–96 (1990).
5. *Kipper, L.* und *Flemmig, R.:* Benzo(a)pyrengehalte in geräuchten Fisch- und Schlachttiererzeugnissen. Fleischwirt. **69,** 1184–1190 (1989).
6. *Stoyke, M., Lusky, K., Doberschütz, K.-D.* und *Göbel, Roswitha:* Untersuchungen zur Belastung von Futtermitteln, Obst und Gemüse mit Benzo(a)pyren (BaP) im Land Brandenburg. Nahrung **38,** 259–266 (1994).
7. *Speer, K., Steeg, E., Hortsmann, P., Kühn, T.* and *Montag, A.:* Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in native vegetable oils, smoked fish products, mussels and oysters, and bream from the river Elbe. High Res. Chromatogr. **13,** 104–111 (1990).
8. *Kicinski, H.G.* und *Kettrup, A.:* Festphasenextraktion und HPLC-Bestimmung von polycyclischen Aromaten aus Trinkwasser. Vom Wasser **71,** 245–254 (1988).
9. *Stijve, T.* and *Hischenhuber, C.:* Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in various food materials by HPLC and TLC. Dtsch. Lebensm. Rundsch. **83,** 276–282 (1987).
10. *Sargredos, A.N., Sinha-Roy, D.* und *Thomas, A.:* Zur Bestimmung, zum Vorkommen und zur Zusammensetzung von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Ölen und Fetten. Fat Sci. Technol. **90,** 76–81 (1988).

11. *Hopia, A., Pyysalo, H.* and *Wickström, K.:* Margarines, butter and vegetable oils as sources of polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Am. Oil Chem. Soc. **63,** 889–893 (1986).
12. *Fritz, W.:* Zur Bildung cancerogener Kohlenwasserstoffe bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln. 5. Mitteilung: Untersuchungen zur Kontamination beim Grillen über Holzkohle. Dtsch. Lebensm.-Rundsch. **69,** 119–122 (1973).
13. *Riha, W.E., Wendorff, W.L.* and *Rank, S.:* Benzo(a)pyrene content of smoked and smoked-flavored cheese products in Wisconsin. J. Food Prot. **55,** 636–638 (1992).
14. *IARC Monographs:* Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs Vol. 1 to 42, Supplement 7, IARC, Lyon 1987.
15. *Dennis, M.J., Massey, R.C., McWeeny, D.J., Knowles, M.E.* and *Watson, D.:* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. Chem. Toxicol. **21,** 569–574 (1983).
16. *Joe, F.L.Jr., Salemme, J.* and *Fazio, T.:* Liquid chromatographic determination of trace residues of polynuclear aromatic hydrocarbons in smoked foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **67,** 1076–1082 (1984).
17. *Salagoity, M.H., Gaye, J., Tricard, C., Desormeaux, M.N.* et *Sudraud, P.:* Dosage du benzo(a)pyrène dans les aliments par chromatographie liquide haute performance. Sci. Alim. **10,** 785–796 (1990).
18. *Perfetti, G.A., Nyman, P.J., Fischer, S., Joe, F.L.Jr.* and *Diachenko, G.W.:* Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **75,** 872–877 (1992).
19. *Geahchan, A., Le Gren, I., Chambon, P.* and *Chambon, R.:* Improved method for determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in pharmacopoeial paraffin and mineral oils. J. Assoc. Off. Anal. Chem. **74,** 968–973 (1991).
20. *Vaessen, H.A.M.G., Wagstaffe, P.J.* and *Lindsey, A.S.:* Reference materials for PAH's in foodstuffs: results of a preliminary intercomparison of methods in experienced laboratories. Frezenius Z. Anal. Chem. **332,** 325–332 (1988).
21. *Dong, M.W.* and *Greenberg, A.:* Liquid chromatographic analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons with diode array detection. J. Liquid Chromatogr. **11,** 1887–1905 (1988).
22. *Kicinski, H.G., Adamek, S.* and *Kettrup, A.:* Trace enrichment and HPLC analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples, using solid phase extraction in connection with UV/VIS detection. Chromatographia **28,** 203–208 (1989).
23. *Quillian, M.A.* and *Sim, P.G.:* Determination of polycyclic aromatic compounds by high-performance liquid chromatography with simultaneous mass spectrometry and ultraviolet diode array detection. J. Chromatogr. Sci. **26,** 160–167 (1988).
24. *Moll, N., Chevrier, S.* and *Moll, M.:* Determination and occurence of 3,4-benzo(a)pyrene in smoked fish and meat products. In: Charalambous, G. (ed), Food flavors, ingredients and composition, 233–245. Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam 1993.
25. *Lawrence, J.F.* and *Weber, D.F.:* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Canadian samples of processed vegetable and dairy products by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Agric. Food Chem. **32,** 794–797 (1984).
26. *Wenclawiak, B.W.* and *Hees, T.:* Optimization of high-performance liquid chromatography and solvent parameters for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons compared with supercritical fluid chromatography with UV detection. J. Chromatogr. A, **660,** 61–65 (1994).
27. *Barker, I.K., Kithinji, J.P., Bartle, K.D., Clifford, A.A., Raynor, M.W., Shilstone, G.F.* and *Halford-Maw, P.A.:* Supercritical fluid chromatography of coal-derived polycyclic aromatic hydrocarbons on packed columns. Analyst **114,** 41–45 (1989).

28. *Rhee, K.S.* and *Bratzler, L.J.:* Benzo(a)pyrene in smoked meat products. J. Food Sci. **35,** 146–149 (1970).
29. *IARC Monographs:* Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Polynuclear aromatic compounds, Part 1, Chemical, environmental and experimental Data, Vol. 32, 477, IARC, Lyon 1983.
30. *Petry, T., Schmid, P.* und *Schlatter, C.:* Aufnahme von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) aus der Luft, über Lebensmittel und am Arbeitsplatz: eine vergleichende Risikobetrachtung. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. **85,** 100–110 (1994).
31. *Simko, P.* and *Knezo, J.:* Influence of cooking on benzo(a)pyrene content in frankfurters. Nahrung **36,** 208–209 (1992).
32. *Gomaa, E.A., Gray, J.I., Rabie, S., Lopez-Bote, C.* and *Booren, A.M.:* Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. Food Addit. Contam. **10,** 503–521 (1993).
33. *Bosset, J.O., Bütikofer, U., Gauch, R.* et *Sieber, R.:* Caractérisation de fromages d'alpages subalpins suisses: mise en évidence de terpènes et d'hydrocarbures aliphatiques lors de l'analyse par «Purge and Trap» des arômes volatils de ces fromages. Schweiz. Milchw. Forschung **23,** 37–41 (1994).
34. *Pfannhauser, W.:* Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) in der Nahrung – Ein Vergleich von Literaturdaten mit einer österreichischen Untersuchung. Ernährung **15,** 217–222 (1991).
35. *Tiefenbacher, K.:* Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe – ubiquitäre Kontaminantien unserer Umwelt. Ernährung **12,** 115–118 (1988).

Dr. Jacques Olivier Bosset
Section chimie
Station fédérale de
recherches laitières
*CH-3097 Liebefeld-Berne*

Oscar Dafflon
Section chimie
Office vétérinaire fédéral
*CH-3097 Liebefeld-Berne*