

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 91 (2000)

**Heft:** 2

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

**Autor:** Dafflon, Oscar / Scheurer, Laurence / Koch, Herbert

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-981862>

#### 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:** 12.01.2026

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

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

Oscar Dafflon, Laurence Scheurer et Herbert Koch, Office vétérinaire fédéral, Liebefeld-Berne

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

Présenté le 17 décembre 1999, accepté le 14 février 2000

## Introduction

Il est aujourd’hui bien établi que certains hydrocarbures aromatiques polycycliques tel que l’ $\alpha$ -benzopyrène ont des propriétés cancérogènes. Ces dernières années, la toxicité de ces composés a donc fait l’objet de nombreuses études, retenant tout particulièrement l’attention des autorités sanitaires. Une série de publications (1–3) a d’ailleurs été consacrée à leur dosage dans diverses denrées alimentaires. Il semble pourtant que leurs dérivés nitrés, le nitropyrrène et le nitrofluorène en particulier, ont des propriétés cancérogènes encore plus élevées (4–7). Le contaminant le plus dangereux est le nitropyrrène. Dans une optique de prévention et de surveillance des HAP nitrés, l’Office vétérinaire fédéral a effectué des contrôles ponctuels de la qualité de plusieurs types de poissons et de produits carnés et laitiers fumés, contrôles qui font l’objet du présent travail.

La présence d’hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de HAP nitrés dans les aliments a différentes origines. On les trouve par exemple dans les gaz d’échappement des voitures et des chauffages thermiques (7, 8). Ils sont également présents dans les divers rejets industriels qui se déposent sur le sol et les plantes. La pollution répétée des eaux de mer par le dégazage des pétroliers et surtout les combustions incomplètes du pétrole qui facilitent la réaction entre les particules de HAP présentes dans l’air (suie) et les oxydes d’azote sont d’importantes sources de pollution (7–9).

Le dosage des HAP nitrés dans les matrices biologiques a été décrit par de nombreux auteurs (10–18). Schlemitz et Pfannhauser (12, 13) ont passé en revue les principales méthodes d'analyse publiées jusqu'à 1996, comparant plusieurs techniques de détection (MSD, NPD) en chromatographie gazeuse. Les méthodes les plus utilisées pour la détermination des HAP nitrés dans les matrices biologiques sont la chromatographie liquide à haute performance avec une détection dans l'UV (HPLC-UV) (14) ou par fluorescence (HPLC-FL) (15). Certains travaux ne traitent d'ailleurs que du dosage du seul nitropryrène (16). L'utilisation du détecteur à fluorescence nécessite la réduction des HAP nitrés en HAP aminés, ce qui permet d'abaisser sensiblement les limites de détermination de la méthode. La détection à l'aide d'un détecteur à fluorescence reste en effet l'une des méthodes les plus performantes du point de vue de la spécificité et de la sensibilité. Elle permet de travailler dans le domaine du picogramme.

Les méthodes de réduction des HAP nitrés citées dans la littérature ont été testées. La méthode de réduction en ligne à 80 °C sur colonne catalytique au Pt/Rh n'a pas donné satisfaction (15). La préparation de la colonne est compliquée. En outre, elle nécessite un ralentissement du flux sur la colonne de réduction ce qui diminue tant la résolution chromatographique que la répétabilité des résultats. Enfin, il est très difficile d'optimiser le rendement de la réduction des HAP nitrés en HAP aminés, car la capacité même de réduction de la colonne varie constamment. La réduction avec le di-thionite de sodium (17) n'a pas non plus donné de résultats fiables avec des matrices biologiques.

En revanche, la réduction avec le zinc (18) s'est révélée efficace. Elle a l'avantage d'être simple et fiable, la réaction se déroulant à température ambiante à pH 3. Elle facilite également le clean-up: les résidus de graisses s'agglutinent sur l'excès de zinc en poudre et sont ainsi éliminés.

Pour le présent travail déjà présenté sous la forme d'une communication préliminaire (19), la méthode HPLC-FL avec une réduction des HAP nitrés à l'aide de zinc a été simplifiée, optimisée puis appliquée en routine à divers échantillons provenant du commerce.

## Partie expérimentale

### Principe de l'analyse

La méthode proposée recourt à une extraction des HAP nitrés avec de l'acetonitrile à l'aide d'un Soxhlet. Le clean up s'effectue sur une colonne de gel de silice. On peut alors séparer chromatographiquement les composées à doser par une élution à gradient sur une colonne à phase inverse (RP-HPLC). La détection est opérée par fluorescence à une longueur d'onde variable programmée. La limite de détermination mesurée (rapport signal/bruit de fond = 3) est de l'ordre de 0,05 ng/g ou 0,5 pg en quantité absolue (volume injecté: 10 µl) pour un mélange d'une solution mixte de standards. La limite de détermination est au moins de 0,05 µg/kg en présence d'une matrice de type poisson (méthode d'ajouts standards).

## Réactifs

- Acétonitrile (Merck, LiChrosolv, art. no 100030)
- n-Hexane (Macherey-Nagel, art. no C253634859)
- Dichlorméthane (Macherey-Nagel, art. no C2510l)
- Solution d'élution: n-hexane/dichlorméthane dans le rapport volumique 4/1
- Sulfate de sodium p.A. (J.T. Baker, 12–60 mesh p.A., art. no 3375)
- Méthanol (Merck, LiChrosolv, art. no 106007)
- Eau bidistillée ou de qualité équivalente (par ex. Milli-Q)
- Gel de silice (Kieselgel 100, 63–200 µm, Merck, art. no 110184)
- Gel de silice désactivé à 12 % (300 g Kieselgel + 36 ml d'eau)
- Acide chlorhydrique 0,1 mol/l: diluer 0,8 ml d'acide chlorhydrique conc. (Merck, art. no 100317) dans 100 ml d'eau
- Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane (tampon «TRIS», Merck, p.A., art. no 108382) 0,1 mol/l, pH 3,0: dissoudre 1,21 g tampon «TRIS» dans 80 ml d'eau, ajuster à pH 3,0 avec 0,1mol/l d'acide chlorhydrique et compléter à 100 ml avec de l'eau
- Zinc < 45 µm (Merck, art. no 108789)
- Solution mixte de calibrage (concentrée) composée de 4 standards HAP nitrés (1-nitronaphtalène; 2-nitronaphtalène; 2-nitrofluorène; 1-nitropyrrène) à raison de 10 ng de chaque HAP nittré par µl d'acétonitrile (Dr Ehrenstorfer, Bgm. Schlosserstr. 6a, D-86199 Augsburg, art. no L209540)
- Solution mixte de calibrage diluée: diluer 200 fois la précédente solution jusqu'à 50 µg de chaque HAP nittré par litre de méthanol.
- Colonne de clean up en verre (longueur: 45 cm ; diamètre intérieur: 2 cm).

## Choix et provenance des échantillons

Tous les poissons fumés comme les harengs ( $n = 13$ ), les truites ( $n = 6$ ), les saumons ( $n = 39$ ) et divers autres ( $n = 11$ ) provenaient principalement de France, du Danemark et de Norvège; les canards fumés ( $n = 9$ ) ainsi que l'intérieur de «cordons bleus» fourrés avec du jambon ou de la dinde ( $n = 5$ ) ont été prélevés dans un commerce local. Les fromages fumés ( $n = 9$ ) provenaient tous d'Italie, à savoir: 2 Fiore Sardo fumés et 1 non fumé; Mozzarella nature et fumée; Caciocavallo di vacca fumé; Treccia di bufalo fumé; Mozzarella di bufalo fumée; Parmigiano-Reggiano fumé. Un certain nombre d'entre eux ont déjà fait l'objet d'un dosage de HAP non nitrés (5).

## Appareillage

- Analyseur HPLC, Hewlett-Packard type 1081B
- DéTECTEUR DE FLUORESCENCE TYPE 1080 À LONGUEUR D'ONDE PROGRAMMABLE, MERCK-HITACHI
- INTÉGRATEUR HEWLETT-PACKARD TYPE 3396 SERIES III,
- INTÉGRATEUR PC DATA GENERAL, VERSION 3.00, KONTRON, ZÜRICH-MÜLLIGEN
- THERMOSTAT TYPE PELCOOLER POUR LA COLONNE DE SÉPARATION, PROLAB INSTRUMENTS CO, CH-4153 REINACH

- Centrifugeuse Hettich-Rotanta type D72, diamètre de tête 12 cm
- Evaporateur rotatif équipé d'un contrôleur de vide type 168, Büchi, CH-9230 Flawil
- Universal Extraction System 'B-811' (Soxhlet), Büchi, CH-9230 Flawil
- Cartouche d'extraction, 33 x 94 mm (Cellulose), art. No 3500242, Faust, CH-8200 Schaffhausen

### **Mode opératoire optimisé**

Des essais préliminaires non rapportés en détail ont abouti au mode opératoire optimisé suivant:

### **Traitement de l'échantillon**

#### **Extraction**

Dans une cartouche d'extraction, introduire env. 10,0 g (si < 20 g de graisse/kg) ou env. 5,0 g (si > 20 g de graisse/kg) d'échantillon, pesé à 1 mg près. Introduire la cartouche dans le Soxhlet, ajouter 120 ml d'acétonitrile et laisser extraire à 80 °C pendant 4 h. Refroidir l'extrait avec un bain de glace ou pendant une nuit à température ambiante. A l'aide d'un entonnoir, décanter quantitativement la phase surnageante et l'introduire dans un ballon de 300 ml en forme de poire. Evaporer l'extrait à l'acétonitrile jusqu'à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous 200 mbar et à 45 °C (température du bain-marie).

#### **Clean up**

Reprendre le résidu 2 fois de suite dans env. 30 ml du mélange hexane/dichlorométhane 4:1 (v:v) (éventuellement le dissoudre avec un bain à ultrasons) et le porter sur une colonne de clean up contenant 6 g de sulfate de sodium et 30 g de gel de silice désactivé superposés. Eluer avec 150 ml du mélange hexane/dichlorométhane 4:1 (v:v) dans un ballon de 300 ml en forme de poire et réduire à nouveau le volume à l'aide d'un rotavap sous 300 mbar à 45 °C jusqu'à env. 2–3 ml. A l'aide d'une pipette pasteur, transférer quantitativement l'eluat dans un ballon en forme de poire de 10 ml et finalement l'évaporer à sec dans les mêmes conditions d'évaporation que celles susmentionnées.

#### **Réduction**

Avec 1,0 ml de méthanol, reprendre les HAP nitrés ainsi purifiés, ajouter 1,0 ml de tampon Tris pH 3,0 et environ 100 mg de zinc. Agiter alors vigoureusement pendant 15 min à l'aide d'un mélangeur mécanique (Unimax 2010), centrifuger pendant 3 min à 1000 tours/min et injecter immédiatement 10 ml sur la colonne de séparation. Toutes ces opérations doivent être effectuées à l'abri de la lumière.

### *Conditions chromatographiques standards*

- Précolonne type LiChrospher 60 RP-select B, 4 x 4 mm x 5 µm (Merck, art. no 150963)
- Colonne type LiChrospher 60 RP-select B, 250 x 3 mm x 5 µm (Merck, art. no 150155)
- Phase mobile: mélange de méthanol et d'eau dans les proportions indiquées dans le tableau 1a et 1b.
- Débit de l'élution: 0,50 ml/min (cf. Résultats et discussion)
- Température de la colonne: 19 °C (thermostatée)
- Volume injecté: 10 µl (cf. Résultats et discussion)
- Durée de la chromatographie: 26 min

**Tableau 1a  
Programme d'élution standard**

Temps (min)	Méthanol (vol/vol %)	Eau (vol/vol %)	Type de séparation
0,0– 3,0	50	50	Isocratique
3,0–20,0	50 → 100	50 → 0	Gradient
20,0–20,1	100 → 50	0 → 50	Gradient
20,1–26,0	50	50	Isocratique

**Tableau 1b  
Programme d'élution de confirmation**

Temps (min)	Méthanol (vol/vol %)	Eau (vol/vol %)	Type de séparation
0,0– 3,0	50	50	Isocratique
3,0–30,0	50 → 100	50 → 0	Gradient
30,0–30,1	100 → 50	0 → 50	Gradient
30,1–36,0	50	50	Isocratique

Le tableau 2 indique la programmation des longueurs d'onde du détecteur de fluorescence.

**Tableau 2  
Programmation des longueurs d'onde du détecteur de fluorescence**

Temps de rétention (min)	Composé	Excitation (nm)	Emission (nm)	Temps de programmation (min)
10,3	1+2-Nitronaphthalène	233	403	0 –11,5
14,4	2-Nitrofluorène	285	370	11,5–16,5
17,1	1-Nitropyrrène	360	430	16,5–17,7

## Résultats et discussion

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

#### Extraction

La méthode proposée ne nécessite que de 2 à 10 g d'échantillon au lieu des 20 à 100 g indiqués généralement dans la littérature (12, 13). Elle permet ainsi de sensibles économies de temps et de solvant lors de l'extraction. Dans les viandes et les poissons fumés, il est recommandé de ne pas homogénéiser les matrices. Les HAP nitrés provenant du fumage se trouvent en effet à la surface de l'échantillon. Ce mode opératoire sélectif augmente en effet le rendement de l'extraction et facilite le «clean up». A l'inverse, il est conseillé de râper et de mélanger finement les échantillons de fromage après les avoir écrouûtés puisque la croûte de ces fromages n'est pas consommée. En fin d'extraction, il est aussi recommandé de laisser reposer l'extrait pendant une nuit. Les graisses peuvent ainsi se figer ce qui permet de les éliminer par simple décantation.

#### Réduction

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une réduction à l'aide de zinc en poudre à pH 3 et à température ambiante. Le rendement de la réaction est supérieur à celui des méthodes citées dans la littérature (12, 13). Cette technique a l'avantage d'être simple, fiable et rapide. Elle favorise également l'étape de la purification en éliminant les résidus graisseux qui adhèrent aux particules de zinc. Lorsque tous les protons du milieu ont été consommés par l'oxydation du zinc ( $Zn + 2 H^+ \rightarrow Zn^{2+} + H_2 \uparrow$ ) présent en excès, le pH du milieu remonte de la valeur 3,0 (tampon TRIS) jusque vers 6,5–7,0 et la réaction redox s'arrête spontanément. La solution peut alors être injectée. Il est impératif de conserver la poudre de zinc à l'abri de l'air, par ex. sous argon, pour éviter son oxydation, donc une perte de rendement de la réaction.

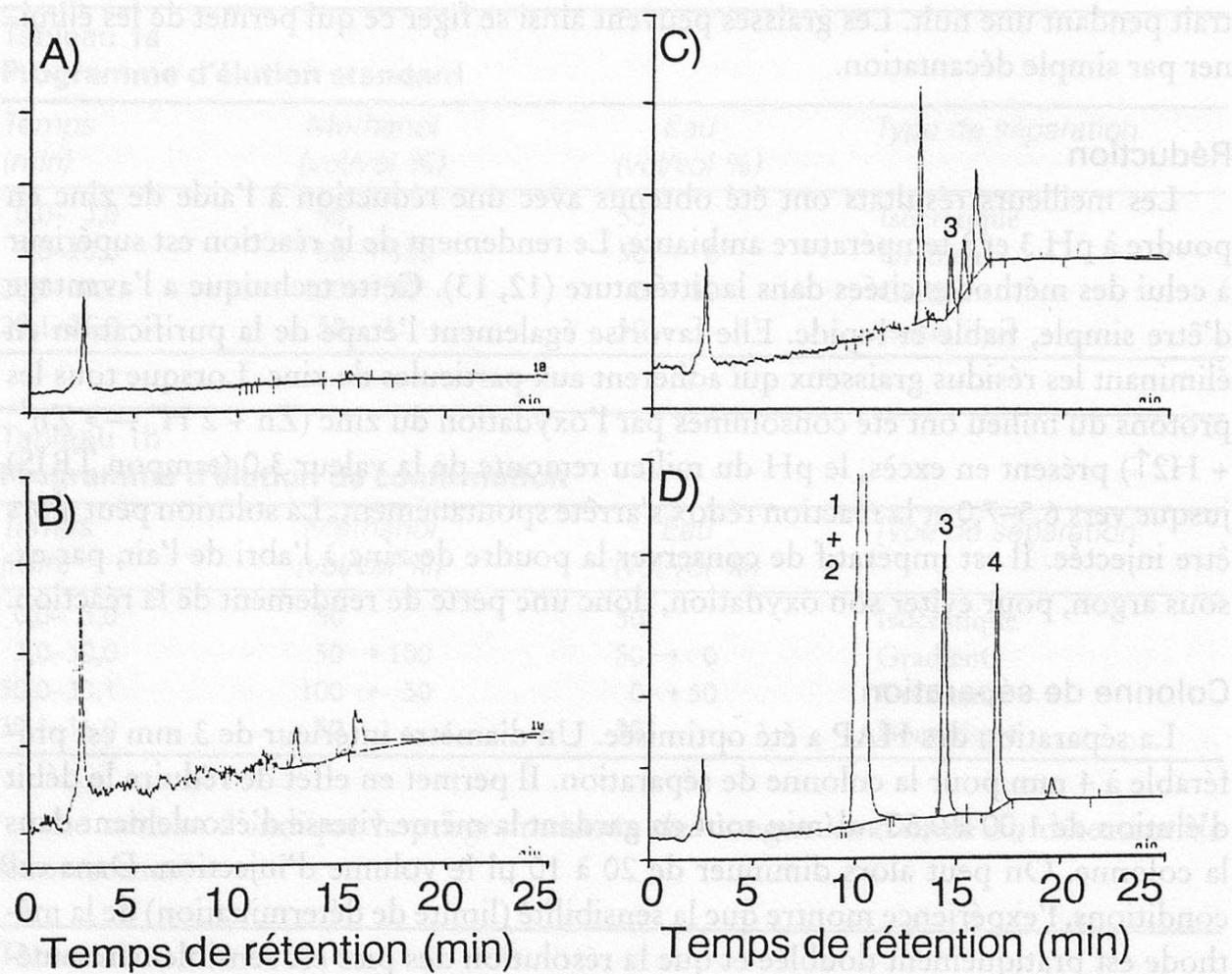
#### Colonne de séparation

La séparation des HAP a été optimisée. Un diamètre intérieur de 3 mm est préférable à 4 mm pour la colonne de séparation. Il permet en effet de réduire le débit d'élution de 1,00 à 0,50 ml/min tout en gardant la même vitesse d'écoulement dans la colonne. On peut alors diminuer de 20 à 10 µl le volume d'injection. Dans ces conditions, l'expérience montre que la sensibilité (limite de détermination) de la méthode est pratiquement doublée et que la résolution des pics est 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 nitrés détectés en répétant l'analyse et en augmentant le temps du gradient d'élution après l'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 nitrés dans méthanol). 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 fumé exempt de HAP nitré (échantillon négatif), la figure 1C, celui d'un échantillon de poisson fumé contenant (au moins) un HAP nitré (échantillon positif) et la figure 1D, le chromatogramme de la solution mixte de calibrage diluée. Les isomères 1- et 2-nitronaphtalène (pics 1 et 2) ne peuvent néanmoins être chromatographiquement résolus.



**Figure 1 Chromatogrammes RP-HPLC-FL d'échantillons:** A) témoin (blanc); B) négatif (poisson exempt de HAP nitrés); C) positif (poisson contenant du 2-Nitrofluorène, pic 3) et D) de référence (solution mixte de calibrage diluée): Pics 1 + 2 (non résolus): 1- et 2-nitronaphtalène, Pic 3: 2-nitrofluorène, Pic 4: 1-nitropyrrène

La figure 1C fait apparaître quelques pics d'origine inconnue, la sensibilité de la détection par fluorescence étant particulièrement élevée. Ces composés ne semblent pas être des HAP nitrés et en aucun cas l'un des composés présentement étudiés qui sont les plus couramment trouvés dans les produits fumés. Ces produits ne sont pourtant pas gênants puisqu'ils sont élus à d'autres temps de rétention. Afin d'éviter toutefois de faux positifs, les chromatogrammes de tous les échantillons considérés comme positifs en utilisant la méthode proposée ont systématiquement été répétés en changeant le gradient d'élution (tableau 1b).

### Taux de récupération

Le taux de récupération de chacun des HAP nitrés considérés a été déterminé à trois différents niveaux de concentration par des ajouts directs («spiking») en procédant comme suit: des quantités égales à 12,5, 25,0, 50 mg respectivement de la solution mixte de calibrage diluée ont été introduites dans les 90 ml d'acétonitrile du Soxhlet contenant 5 g d'échantillon d'un poisson exempt de HAP (comme matrice). Les résultats sont résumés dans le tableau 3.

### Répétabilité

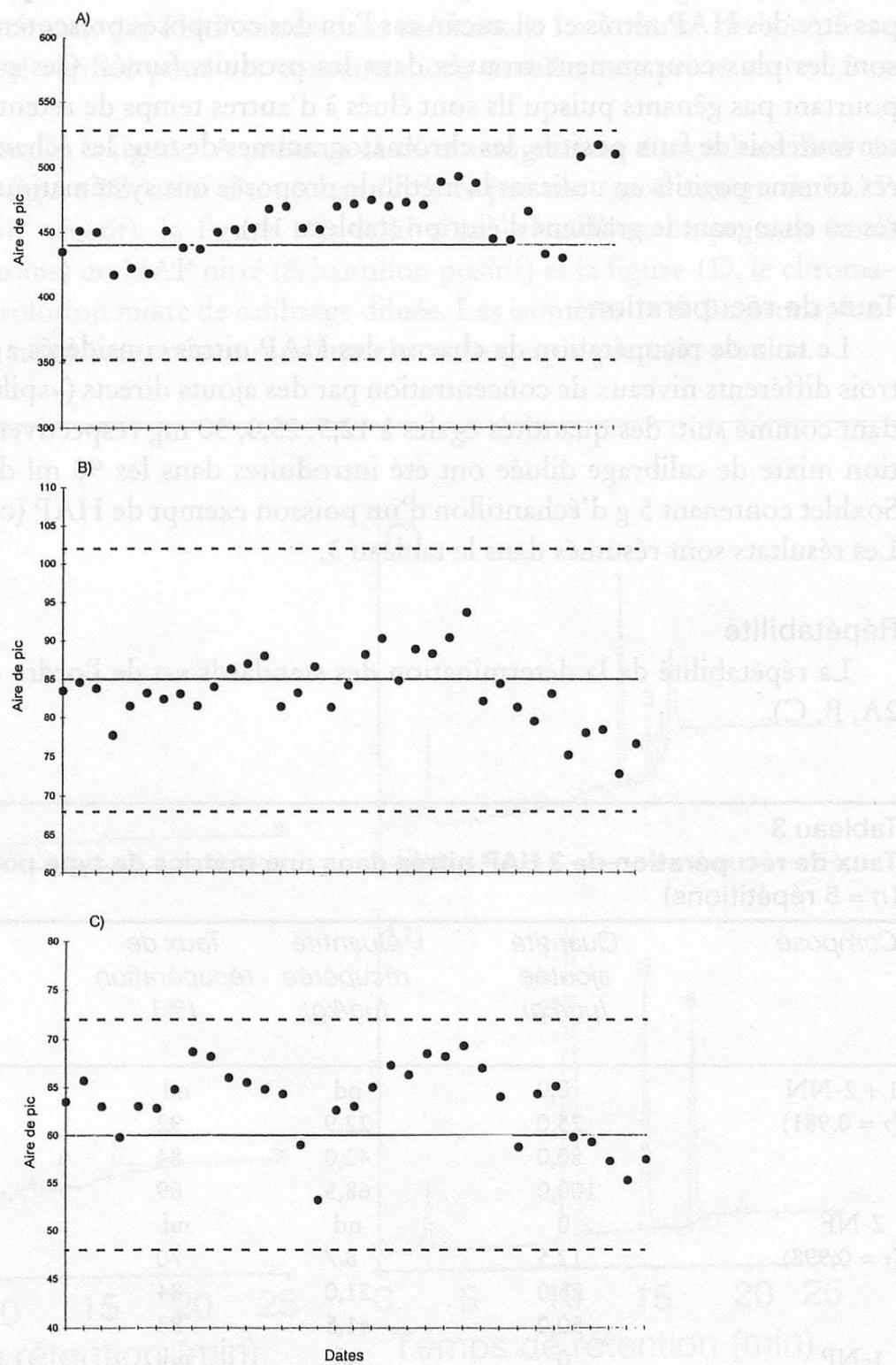
La répétabilité de la détermination des standards est de l'ordre de 20% (cf. fig. 2A, B, C).

**Tableau 3**  
**Taux de récupération de 3 HAP nitrés dans une matrice de type poisson**  
 $(n = 5$  répétitions)

Composé	Quantité ajoutée ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Quantité récupérée ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Taux de récupération (%)	Quantité récupérée estimée* ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1 + 2-NN $(r = 0,981)$	0,0	nd	nd	3,9
	25,0	22,9	92	20,7
	50,0	42,0	84	37,6
	100,0	68,5	69	71,3
2-NF $(r = 0,998)$	0	nd	nd	-0,6
	12,5	8,7	70	9,9
	25,0	21,0	84	20,4
	50,0	41,5	83	41,5
1-NP $(r = 0,993)$	0	nd	nd	0,9
	12,5	13,7	110	11,6
	25,0	21,0	84	22,3
	50,0	43,8	88	43,7

Légende: 1 + 2-NN = 1-nitronaphtalène et 2-nitronaphtalène  
 2-NF = 2-nitrofluorène  
 1-NP = 1-nitropyrrène  
 nd = non détectable (limite de détermination: 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

\* = par régression linéaire  
 $r$  = coefficient de corrélation



**Figure 2 Carte de contrôle de la régularité (Regelkarte) des analyses de 1- et 2-nitronaphtalène (A), de 2-nitrofluorène (B) et de 1-nitropyrrène (C) utilisés comme référence (solution mixte de calibrage diluée) pendant une période de 8 mois consécutifs**

## *Application de la méthode proposée à diverses denrées alimentaires fumées*

Le tableau 4 résume les résultats des analyses de HAP nitrés effectuées de juillet à décembre 1998 sur diverses denrées alimentaires du commerce.

**Tableau 4**  
**Teneur en HAP nitrés de divers produits fumés (fréquence en %)**

Composé	Teneur (µg/kg)	Canard n = 9 (%)	Hareng n = 13 (%)	Truite n = 6 (%)	Saumon n = 39 (%)	Autres poissons n = 11 (%)	Divers fromages n = 9 (%)
1 + 2-NN	< 0,5	66,7	84,6	66,7	87,2	100,0	100,0
	0,05–0,1	11,1	15,4	16,7	2,6	0,0	0,0
	0,1–0,5	11,1	0,0	0,0	10,3	0,0	0,0
	0,5–1,0	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	> 1,0	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0
2-NF	< 0,5	22,2	23,1	16,7	59,0	36,3	100,0
	0,05–0,1	22,2	0,0	16,7	23,1	9,1	0,0
	0,1–0,5	33,3	76,9	33,3	18,0	45,5	0,0
	0,5–1,0	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0
	> 1,0	22,2	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0
1-NP	< 0,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	0,05–0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,1–0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	0,5–1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	> 1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Légende: 1 + 2-NN = 1-nitronaphtalène et 2-nitronaphtalène

2-NF = 2-nitrofluorène

1-NP = 1-nitropyrrène

On trouve les teneurs les plus élevées dans les échantillons de canard, de truite, de hareng et de saumon fumés. Les HAP nitrés les plus fréquemment identifiés sont les 1- et 2-nitronaphtalène ainsi que le 2-nitrofluorène. L'intérieur des cordons bleus analysés était également exempt de HAP nitrés. Le contaminant le plus toxique, le nitropyrrène, n'a été trouvé dans aucun des 92 échantillons analysés.

Quant aux fromages analysés, aucun résidu des 1- et 2-nitronaphtalène, de 2-nitrofluorène et de 1-nitropyrrène n'y a été décelé (la limite de détermination de la méthode est de l'ordre de 0,05 µg/kg). Cette observation peut s'expliquer par le fait que les échantillons de fromages ont été écrouûtés avant l'analyse, ce qui diminue beaucoup le risque de contamination puisque le fumage est essentiellement un phénomène de surface. La croûte de ces fromages n'est en effet ni consommable, ni consommée, ce qui n'est pas le cas de la surface des autres denrées alimentaires analysées dans ce travail (produits de la pêche et produits carnés). D'autres raisons semblent pourtant devoir expliquer cette totale absence de HAP nitrés puisque certains des échantillons de fromages fumés considérés dans ce travail présentaient des

teneurs parfois considérables en HAP non nitrés (5). On peut en conclure que les conditions de formations des HAP non nitrés peuvent différer sensiblement de celles de formation des HAP nitrés.

## Conclusion

Les simplifications et améliorations proposées permettent un abaissement de la limite de détection des HAP nitrés et une amélioration de la qualité de leur séparation chromatographique, à l'exception des 1- et 2-nitronaphtalène qui demeurent non résolus. Elles portent essentiellement sur l'étape de réduction des HAP nitrés en HAP aminés. On peut aussi relever la quasi-absence 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 détermination de 0,05 ng/ml ou de 0,5 pg (pour un volume injecté de 10 µL et pour un rapport signal/bruit de fond égal à 3). Les taux d'extraction sont compris entre 70 et 100 %. La répétabilité des dosages est de l'ordre de 20 % relatifs dans les matrices susmentionnées.

L'application en routine de cette méthode à des échantillons de poissons et des produits carnés fumés a montré que la contamination est liée aux techniques de fabrication et de production mises en œuvre lors du fumage. On y trouve occasionnellement les 1- et 2-nitronaphthalène et le 2-nitrofluorène dans des concentrations de l'ordre du µg/kg. Le 1-nitropyrène, particulièrement toxique, n'y a jamais été mis en évidence. Aucun des fromages fumés analysés ne contenait de HAP nitrés, même pas ceux qui contenaient des quantités importantes de HAP non nitrés. Pour ces derniers échantillons, deux explications sont envisageables: i) la croûte – qui a été éliminée puisqu'elle n'est ni consommée, ni consommable – pourrait jouer le rôle de filtre qui retient ou décompose ces composés nitrés; ii) les conditions de fumage des fromages ne sont pas propices à la formation de HAP nitrés. La présence de HAP non nitrés dans plusieurs d'entre eux tendrait à étayer cette seconde explication.

Vu l'extrême toxicité de ces composés aux indéniables propriétés cancérogènes, il serait souhaitable de fixer dès que possible des teneurs maximales admissibles du point de vue toxicologique qui tiennent compte des limites de détermination, soit 0,05 µg/kg de denrées alimentaires, comme c'est par exemple le cas pour le benzo(a)pyrène avec 1 g/kg (1-3).

## Remerciements

Les auteurs remercient leurs collègues pour la lecture critique du manuscrit, le Dr R. Sieber de la FAM en particulier, qui a également mis à disposition ses références bibliographiques.

## Résumé

Le présent travail propose quelques améliorations et simplifications apportées au dosage par RP-HPLC de 4 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) nitrés (1- et 2-nitronaphthalène, 2-nitrofluorène et 1-nitropyrrène) dans diverses denrées alimentaires. Elles concernent surtout l'étape de la réduction des HAP nitrés en HAP aminés par le zinc à pH 3 et le clean up des échantillons. La détection est de type spectrofluorométrique à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission variables programmées. Il en résulte un abaissement des limites de détection et une amélioration de la résolution chromatographique de ces composés. Les taux de récupération déterminés par des ajouts connus sont supérieurs à 70 %. La répétabilité est voisine de 20 % relatifs et la limite de détermination dans les matrices considérées, de l'ordre de 0,05 µg/kg. L'application de cette méthode en routine est simple et rapide. Elle a montré que les HAP nitrés sont surtout présents dans les denrées alimentaires fumées ( $n = 92$ ) telles que poissons ( $n = 69$ ) et produits carnés ( $n = 14$ ). Dans le cas de fromages fumés ( $n = 9$ ) analysés après écrouûtage, aucun résidu de HAP nitré n'a été décelé.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt einige Verbesserungen und Vereinfachungen der RP-HPLC-Bestimmung von vier nitropolycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Nitro-PAK): 1- und 2-Nitronaphthalen, 2-Nitrofluoren und 1-Nitropyren in verschiedenen Lebensmitteln. Dies betrifft vor allem die Reduktion der Nitro- in Amino-PAK mit Zink bei pH 3 und die Probenaufarbeitung. Die Detektion erfolgt mittels Fluoreszenzspektrometrie mit vorprogrammierten variablen Wellenlängen. Diese Modifikationen der Analysenmethode erniedrigen die Nachweisgrenze und verbessern die chromatographische Auflösung der einzelnen Komponenten. Die mit einer Additionsmethode bestimmte Wiederfindungsrate (dotierte Proben) liegt bei über 70 %, die Reproduzierbarkeit bei 20 % und die Nachweisgrenze bei 0,05 µg/kg. Die Anwendung dieser Methode für Routinebestimmungen ist einfach und schnell. Sie hat aufgezeigt, dass die Nitro-PAK vor allem in geräucherten Lebensmitteln ( $n = 92$ ) wie Fischen ( $n = 69$ ) und Fleischwaren ( $n = 14$ ) enthalten sind. In verschiedenen geräucherten Käsesorten ( $n = 9$ ) sind nach Entfernung der Rinde keine Nitro-PAK-Rückstände nachweisbar.

## Summary «Quantification of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish, Meat Products and Cheese using High Performance Liquid Chromatography»

Improvements and simplifications of the RP-HPLC method for the determination of 4 polycyclic aromatic nitro-hydrocarbons (nitro-PAHs: 1- and 2-nitronaphthalene, 2-nitrofluorene and 1-nitropyrene) in various foods are described. The proposed modifications mainly concern the reduction of the nitro- into amino-derivatives using zinc at pH 3.0 and a clean up of the sample. The detection is

performed using fluorescence spectroscopy at preprogrammed wavelengths. The recovery rate determined with spiked samples at various concentrations is greater than 70 %. The repeatability is close to 20 %. The detection limit is 0.05 µg/kg for the matrices considered. This method is time and work saving and is suitable for routine analysis. Nitro-PAHs were only found in smoked foods from the market ( $n = 92$ ) such as fish ( $n = 69$ ) and meat products ( $n = 14$ ). No traces of such compounds could be detected in smoked cheese ( $n = 9$ ) after discarding the cheese rind.

## Key words

Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons, Nitropolycyclic aromatic hydrocarbons, HPLC, Fluorescence detection, Smoked products

## Bibliographie

- 1 Dafflon, O., Gobet, H., Koch, H. et Bosset, J.O.: Le dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le poisson, les produits carnés et le fromage par chromatographie liquide à haute performance. *Trav. chim. aliment. hyg.* **86**, 534–555 (1995).
- 2 Bosset, J.O., Bütkofer, U., Sieber, R., Dafflon, O., Koch, H. und Scheurer, L.: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe in Käsen. *Agrarforschung* **4**, 411–414 (1997).
- 3 Bosset, J.O., Bütkofer U., Dafflon O., Koch H., Scheurer L. et Sieber R.: Teneur en hydrocarbures aromatiques polycycliques de fromages avec et sans goût de fumée. *Sci. Aliments* **18**, 347–359 (1998).
- 4 Nesnow, S., Triplett, L.L. and Slaga, T.J.: Tumor initiating activities of 1-nitropyrene and its nitrated products in SENCAR mice. *Cancer Letters* **23**, 1–8 (1984).
- 5 Cui, X.S., Eriksson, L.C. and Moller, L.: Formation and persistence of DNA adducts during and after a long-term administration of 2-nitrofluorene. *Mutat.Res.* **442**, 9–18 (1999).
- 6 Cui, X.S., Torndal, U.B., Eriksson, L.C. and Molle, L.: Early formation of DNA adducts compared with tumor formation in a long-term tumor study in rats after administration of 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis* **16**, 2135–2141 (1995).
- 7 Moller, L., Lax, I. and Eriksson, L.C.: Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons: a risk assessment for the urban citizen. *Environ. Health Perspect.* **101** (10) Suppl 3, 309–15 (1993).
- 8 Zwirner-Baier, I. and Neumann, H.G.: Polycyclic nitroarenes (nitro-PAHs) as biomarkers of exposure to diesel exhaust. *Mutat. Res.* **441**, 135–44 (1999).
- 9 Pitts, J.N.: Nitration of gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons in simulated and ambient urban atmospheres: a source of mutagenic nitroarenes. *Atmos. Environm.* **21**, 2531–2547 (1987).
- 10 Dennis, M.J., Massey, R.C., McWeeny, D.J. and Knowles, M.E.: Estimation of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in foods. *Food Addit. Contam.* **1**, 29–37 (1984)
- 11 Schlemitz, S. and Pfannhauser, W.: Monitoring of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in food using gas chromatography. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **203**, 61–4 (1996).
- 12 Schlemitz, S. and Pfannhauser, W.: Analysis of nitro-PAHs in food matrices by on-line reduction and high performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* **13**, 969–977 (1996).
- 13 Schlemitz, S. and Pfannhauser, W.: Production of a certified reference material containing polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro-derivatives. Communication personnelle. Institute of Biochemistry and Food Chemistry, Dep. of Food Chemistry, Petersgasse 12, AT-8010 Graz.
- 14 Liu, T. and Robbat, A.: High performance liquid chromatography retention index and detection of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Chromatogr.* **539**, 1–14 (1991).

- 15 *Tejada, S.B., Zweidinger, R.B. and Sigsby, J.E.*: Fluorescence detection and identification of nitro derivatives of polynuclear aromatic hydrocarbons by on-column catalytic reduction to aromatic amines. *Anal. Chem.* **58**, 1827–1834 (1986).
  - 16 *Kinouchi, T., Tsutsui, H. and Ohnishi, Y.*: Detection of 1-nitropyrene in yakitori (grilled chicken). *Mutation Res.* **171**, 105–113 (1986).
  - 17 *Kamiura, T., Kawaraya, T., Tanaka, M. and Nakadoi, T.*: Determination of 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene in suspended particulate matter by liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* **254**, 27–31 (1991).
  - 18 *Sigvardson, K.W. and Birks, J.W.*: Detection of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid chromatography by zinc reduction and peroxyoxalate chemiluminescence. *J. Chromatogr.* **316**, 507–518 (1984).
  - 19 *Koch, H. and Dafflon, O.*: Polycyclic aromatic nitro-hydrocarbons (PANH): Their occurrence in smoked, dried, roasted fish and meat. Proceedings of the 45<sup>th</sup> Internat. Conference of Meat Science and Technology, August 1–6, 1999, Yokohama, Japan.

Adresse du correspondant: Oscar Dafflon, Office vétérinaire fédéral,  
CH-3003 Berne, oscar.dafflon@bvet.admin.ch