

液相色谱-串联四级杆质谱对食品中 丙烯酰胺的测定研究

樊 祥¹, 方晓明², 陈家华², 吕敬慈¹, 张星漪³

(1. 上海大学 化学系, 上海 200436; 2. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135;

3. 上海水产大学 食品学院, 上海 200090)

摘 要: 用液相色谱-串联四级杆质谱法检测食品中丙烯酰胺的含量。添加氘标记的内标 d_3 -丙烯酰胺于样品中, 经纯水提取, 用 Oasis HLB 和 Bond Elut Accucat 固相萃取柱净化。Zorbax XDB-C₁₈ 色谱柱分离, 流动相为 MeOH-H₂O (体积比 1: 99) 含 0.1% HAc 溶液, 流速 0.19 mL/min。电喷雾正离子 MRM 模式检测: 丙烯酰胺 m/z 72⁺ 55, 内标 m/z 75⁺ 58。内标法定量, 方法定量下限 (LOQ, $S/N > 10$) 为 50 ng/g。在质量浓度 0.005~100 μg/mL 范围内, 峰面积与浓度成良好线性 ($r > 0.998$)。本法快速、准确、检出限低、实用性强。

关键词: 液相色谱; 串联四级杆质谱; 丙烯酰胺; 食品

中图分类号: O657.72 O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2005)03-0082-04

Determination of Acrylamide in Foods by Liquid Chromatography/Tandem Quadrupole Mass Spectrometry

FAN Xiang¹, FANG Xiao_ming², CHEN Jia_hua², LÜJing_ci¹, ZHANG Xing_yi³

(1. Department of Chemistry, Shanghai University, Shanghai 200436, China; 2. Shanghai Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 3. College of Food, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Acrylamide in foods was determined by liquid chromatography with tandem quadrupole mass spectrometry. A sample spiked with deuterium-labeled acrylamide- d_3 (internal standard) was extracted with water, and centrifugated at high speed. An aliquot of the supernatant was filtered through a Maxi_Spin (0.45 μm PVDF) filter. The filtrate was purified by SPE with Oasis HLB cartridge and Bond Elut Accucat cartridge. Chromatographic separation was carried out on a Zorbax XDB-C₁₈ column (2.1 × 150 mm, 5 μm) with elution of methanol-water (1: 99 by volume) containing 0.1% acetic acid at a flow rate of 0.19 mL/min. The mass spectrometer was operated in the positive electrospray ionization mode. Quantitation was performed using multiple reaction monitoring of the product ion transitions m/z 72⁺ 55 for acrylamide and m/z 75⁺ 58 for acrylamide- d_3 . Linearity of peak area was obtained over a wide range of concentrations (from 0.005 to 100 μg/mL), and the correlation coefficient was greater than 0.998. The method had a limit of quantitation (LOQ, $S/N > 10$) of 50 ng/g. The method was sensitive, reliable, selective and reproducible.

Key words: Liquid chromatography; Tandem quadrupole mass spectrometry; Acrylamide; Food

丙烯酰胺 ($H_2C=CHCONH_2$) 俗称丙毒, 是一种水溶性的神经性毒素, 容易被人体的消化道、呼吸道、皮肤等组织吸收, 可损坏神经、DNA 等, 对人体有较大的危害。世界卫生组织 (WHO) 制订的标准规定“每个成年人每天摄入的丙烯酰胺量不应超过 1 μg”。2002 年 4 月瑞典国家食品管理局 (NFA) 公布的一项研究表明, 在烘烤、煎炸食品中含有大量丙烯酰胺。2002 年 5 月英国食品标准局 (FSA) 在网上公布的数据确证了瑞典公布的结果, 并将丙烯酰胺定级为“人类可能致癌物”。随后世界卫生组织对外宣布了对西式快餐的化验结果, 发现薯条、薄脆饼、烤猪肉的棕色脆皮等大量煎烤油炸食品中都含有丙烯酰胺, 部分食品中其含量已超过标准的 400 倍。最近有人研究丙烯酰胺在高温加热食品中的形成机理^[1, 2], 表明是由于碳水化合物食品在烘烤、煎炸过程中, 氨基酸天冬酰胺和葡萄糖产生了美拉德反应 (Maillard reaction), 丙烯酰胺是其反应的副产物。

收稿日期: 2004-05-13; 修回日期: 2005-01-23

作者简介: 樊 祥 (1979-), 男, 辽宁营口人, 硕士研究生; 方晓明, 联系人, Tel: 021-68549999-15126,

E-mail: fangxm@shciq.gov.cn

国外对食品中丙烯酰胺测定方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)^[3~5]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS-MS)^[3~7],而国内在这一领域没有相关的文献报道。本文采用LC-MS-MS法测定食品中丙烯酰胺,样品通过Oasis HLB固相萃取柱和Bond Elut Accucat固相萃取柱净化,反相色谱分离,MS-MS检测。本方法快速、准确,并应用于实际样品分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

丙烯酰胺(99%, Sigma-Aldrich公司), 氘化丙烯酰胺(2, 3, 3-d₃丙烯酰胺, 98%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc), 100 µg/mL标准储备液用水配制, 根据需要用稀释至适当的浓度。甲醇(LC级, Fisher公司), 其它试剂均为分析纯。超纯水由Milli-Q净化器(Millipore公司)制得。

Waters 2690液相色谱-串联四级杆质谱(Quattro LC)联用仪(Waters公司)。Oasis HLB(6 mL, 200 mg)固相萃取柱(Waters公司)和Bond Elut Accucat(3 mL, 200 mg)固相萃取柱(Varian公司), 固相萃取装置(Supelco公司)。高速离心机(Beckman公司), 均质器(Scientific, Inc), 旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), Maxi-Spin(0.45 µm PVDF)滤膜(Alltech Associates公司)。

1.2 模拟样制备

模拟样制备参考文献[8]略作改进: (1) 土豆泥: 将已削皮、洗净的土豆切成块状置于烧杯中, 用锅水浴蒸熟。将煮熟的土豆置于研钵中捣碎, 称取100 g土豆泥于烧杯中, 加入60 mL植物油, 用玻璃棒充分混和。(2) 面团: 称取100 g面粉于烧杯中, 加入80 mL植物油, 混合。

1.3 样品处理

准确称取0.5~2 g已粉碎的样品(如果样品溶于水呈粘稠糊状, 适当减少称样量), 置于15 mL的聚丙烯锥形管中, 加0.4 mL 10 µg/mL的内标液(视丙烯酰胺含量情况, 可酌情添加), 用水加注至10 mL, 均质3 min, 充分振荡5 min, 于12 000 r/min下离心30 min。用5 mL的注射器迅速吸取中间清液, 过Maxi-Spin(0.45 µm PVDF)滤膜, 取2 mL滤液过Oasis HLB固相萃取柱(预先用5 mL甲醇和5 mL水活化), 待滤液全部流出小柱后, 将其上接在Bond Elut Accucat固相萃取柱(预先用3 mL甲醇和3 mL水活化)上, 用2 mL水洗脱, 收集洗脱液, 供测试。

1.4 分析条件

色谱柱为Zorbax XDB-C₁₈(2.1×150 mm, 5 µm), 以MeOH-H₂O(体积比1:99)含0.1% HAc作为流动相, 流速0.19 mL/min, 进样量20 µL, 柱温26 °C。

电喷雾正离子MRM模式检测, 毛细管电压3.2 kV, 锥电压15 V, 源温度120 °C, 喷雾温度350 °C, 雾化气50 L/h, 喷雾气414 L/h, 碰撞电压13 V, 检测离子: 丙烯酰胺 m/z 72⁺ 55, 同位素内标 m/z 75⁺ 58。

2 结果与讨论

2.1 提取方法

实验表明, 高速离心是提取过程的关键。我们曾用4 400 r/min对模拟样品离心30 min, 取出离心试管后发现离心不完全, 上层油相和下层固体相很快渗入中间水相, 呈混浊状。改用12 000 r/min离心30 min后, 样液明显分为3层, 得到较清的中间水相提取液。丙烯酰胺极易溶于水, 我们也尝试使用酸性水溶液和食盐水溶液等, 但经固相萃取提取后, 得到的结果都不理想。在操作时, 如果样品加水后比较粘稠, 可适当减小称样量, 使离心后能得到足够多的中间清液。提取时要充分均质、振荡, 使丙烯酰胺尽可能地提取到水中, 但不可超声, 否则会产生乳化或细小的颗粒堵塞Maxi-Spin(0.45 µm PVDF)滤膜, 或者渗入Oasis HLB柱中影响柱子保留能力。

2.2 净化方法

样品提取液通过Oasis HLB柱和Bond Elut Accucat柱净化。首先将提取液注入预先活化好的Oasis

HLB 柱,使其自然下滴,除去不被保留的疏水性及中性有机物和油脂类物质,用水以 1 滴/s 流速洗脱保留在柱中的丙烯酰胺(不可抽真空)。洗脱液再经 Bond Elut Accucat 柱净化,此时离子化合物、盐等组分被吸附在柱中,丙烯酰胺不被保留而流出,收集流出液,供测试。

2.3 质谱条件的选择

试验了不同参数如锥电压、毛细管电压及碰撞电压对检测的影响。结果表明,锥电压在通常 10~ 80 V 内对丙烯酰胺及内标的质谱图影响不大。毛细管电压在 0.5~ 4.0 kV 范围对丙烯酰胺检测响应的影响较大,色谱峰面积随毛细管电压的增加而增大,在超过 3.0 kV 时峰面积趋于平缓,因此我们选取毛细管电压 3.2 kV。碰撞电压主要控制丙烯酰胺及内标前体离子的断裂,给出碎片离子。在碰撞电压 10~ 20 V 间, m/z 55 和 m/z 58 碎片离子的强度比较大,因此选择这两个离子作为定量检测离子(图 1)。碰撞电压大于 15 V 时, m/z 44, 27 和 m/z 30 离子的强度有所增强,但 m/z 55 和 m/z 58 离子强度减弱,因此碰撞电压选择 13 V 为宜。图 2 给出了丙烯酰胺可能的裂解途径。

2.4 方法回收率、精密度、线性范围及检出限

取适量丙烯酰胺及内标标准液加至 2 g 土豆和面团模拟样品中,使添加量相当于 0.100、0.500、1.00 $\mu\text{g/g}$,按“1.3”节所述步骤处理样品,回收率结果见表 1。该方法回收率不高,但在实际样品检测过程添加了内标,内标与丙烯酰胺同步损失,因此通过内标法定量,该方法可满足实际检测的需要。

表 1 加标法测定丙烯酰胺的回收率($n=5$)
Table 1 Recovery of acrylamide spiked into blank samples($n=5$)

Sample	Added $w/10^{-6}$	Recovery $R/\%$	Average recovery $\bar{R}/\%$	RSD $s_r/\%$
Potato paste	0.100	51.8, 54.2, 47.3	49	8.6
Flour paste	0.100	45.3, 44.7		
Potato paste	0.500	52.3, 48.4, 53.7	54	13.2
Flour paste	0.500	51.1, 64.1		
Potato paste	1.00	37.1, 40.0, 44.0	41	6.9
Flour paste	1.00	43.6, 42.3		

对 0.200 $\mu\text{g/mL}$ 丙烯酰胺标液进行了 8 次平行实验,得出相对标准偏差(RSD)为 5.2%。

在质量浓度为 0.005~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内,峰面积和浓度成良好的线性关系,线性相关系数大于 0.998。根据 3 倍信噪比确定检出限为 5 ng/mL 。根据样品能可靠测得的最低浓度确定定量下限(LOQ, $S/N > 10$)为 50 ng/g 。

2.5 应用

图 3 为实际薯片样品的 LC-MS-MS 图,丙烯酰胺和内标的保留时间约 4.2 min,虽然它们在色谱柱上没有分离,但通过质量分析器可选择性地鉴别。按内标法计算得出,几种代表性的烘烤、煎炸食品中丙烯酰胺含量为薯片 3344 ng/g ,爆米花 783 ng/g ,方便面 87 ng/g 。

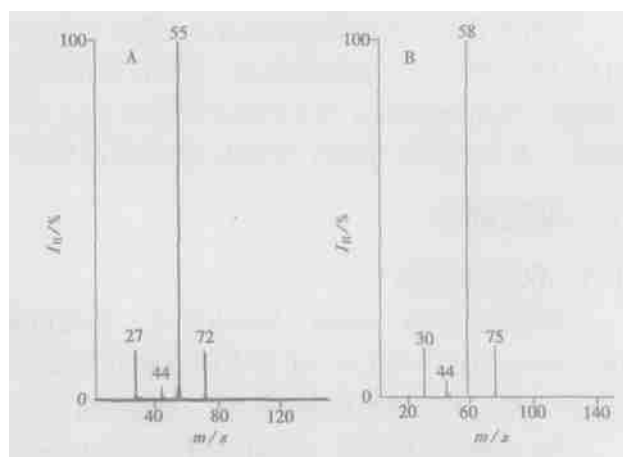


图 1 丙烯酰胺(A)和 d_3 丙烯酰胺(B)碎片离子的质谱图
Fig. 1 Fragment ion spectra of acrylamide (A) and acrylamide- d_3 (B)
collision voltage: 15 V; content: 100 $\mu\text{g/mL}$.

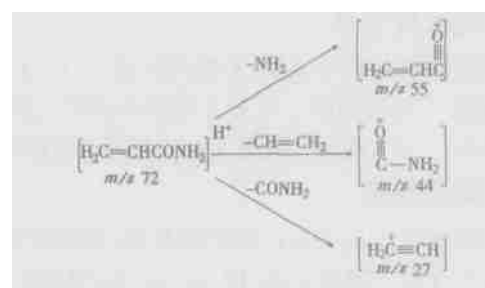


图 2 丙烯酰胺裂解途径
Fig. 2 Proposed fragmentation pathways for acrylamide

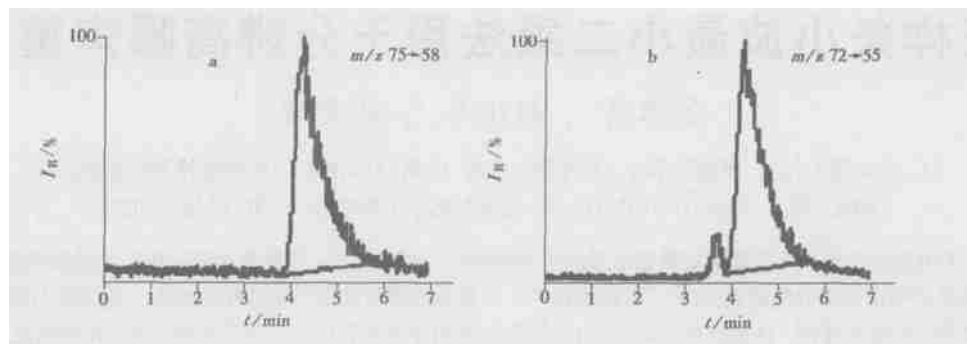


图3 薯片样品的LC-MS-MS图

Fig. 3 Mass chromatograms of potato crisp samples

a. acrylamide-d₃; b. acrylamide

参考文献:

- [1] ZYZAK D V, SANDERS R A, STOJANOVIC M, *et al.* [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51(16): 4782- 4787.
- [2] VATTEM D A, SHETTY K. [J]. Inno Food Sci Emerging Tech, 2003, 4(3): 331- 338.
- [3] ONO H, CHUDA Y, OHNISHI- KAMEYAMA M, *et al.* [J]. Food Addit Contam, 2003, 20(3): 215- 220.
- [4] TAREKE E, RYDBERG P, KARLSSON P, *et al.* [J]. J Agric Food Chem, 2002, 50(17): 4998- 5006.
- [5] CLARKE D B, KELLY J, WILSON L A. [J]. J AOAC Int, 2002, 85(6): 1370- 1373.
- [6] SVENSSON K, ABRAMSSON L, BECKER W, *et al.* [J]. Food Chem Toxic, 2003, 41(11): 1581- 1586.
- [7] KONINGS E J M, BAARS A J, VAN KLAVEREN J D, *et al.* [J]. Food Chem Toxic, 2003, 41(11): 1569- 1579.
- [8] ROSEN J, HELLENAS K- E. [J]. Analyst, 2002, 127(7): 880- 882

(上接第81页)

- [5] BARROS A M, DHANABALAN A, CONSTANTINO C J L, *et al.* [J]. Thin Solid Films, 1999, 354: 215- 221.
- [6] QIN Tefu. [J]. Scientia Silve Sinica(秦特夫. [J]. 林业科学), 2001, 14(4): 375- 382.
- [7] SUN R C, SUN X F, FOWLER P, *et al.* [J]. European Polymer Journal, 2002, 38: 1399- 1470.
- [8] HATTALLI S, BENABOURA A, HAM- PICHAVANT F, *et al.* [J]. Polymer Degradation and Stability, 2002, 75: 259- 264.
- [9] LI Jian. Wood Spectroscopy[M]. Beijing: Science Press(李 坚. 木材波谱学[M]. 北京: 科学出版社), 2003. 109- 110.
- [10] JIANG Tingda. Lignin[M]. Beijing: Chemical Industry Press(蒋挺大. 木质素[M]. 北京: 化学工业出版社), 2001. 64.
- [11] FAIX O. [J]. Holzforschung, 1991, 45(suppl): 21- 27.
- [12] LU Xian, LIU Mingyou, LI Youming *et al.* [J]. Heilongjiang Paper(卢 娴, 刘明友, 李友明, 等. [J]. 黑龙江造纸), 1999, 3: 3- 5.
- [13] ABD- ALLA M A N, YOUSEF M A, SHAFFEI K A, *et al.* [J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 62: 157- 163.
- [14] SUN R C, TOMKINSON J. [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2002, 9: 85- 93.
- [15] HUANG Feng, GAO Peiji, CHEN Jiayang. [J]. Science in China(Series E)(黄 峰, 高培基, 陈嘉翔. [J]. 中国科学(E 辑)), 2000, 30(1): 91- 96.
- [16] M DAWY A, SHABAKA A, NADA A M A. [J]. Polymer Degradation and Stability, 1998, 62: 455- 462.
- [17] TERASHIMA N, HHFRÉN J, WESTEMARK U, *et al.* [J]. Holzforschung, 2002, 56: 43- 50.
- [18] LI Zhiqing, CHEN Zhonghao, LIN Shuming. [J]. Journal of Cellulose Science and Technology(李志清, 陈中豪. [J]. 纤维素科学与技术), 1993, 1(2): 39- 45.