

液相色谱-电喷雾质谱/质谱法测定高温烹制的 淀粉类食品中的丙烯酰胺

赵 榕¹, 邵 兵¹, 赵 婕¹, 吴永宁², 吴国华¹, 薛 颖¹

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013 ; 2. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100025)

摘要 :以 C₁₈ 反相色谱柱为分析柱,以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(体积比为 98:2)为流动相,采用同位素稀释液相色谱-电喷雾质谱/质谱(LC-MS/MS)技术对加热淀粉类食品中的丙烯酰胺进行了测定。利用 Oasis HLB 固相萃取柱对样品进行净化。方法的线性范围为 10 ~ 500 $\mu\text{g/L}$,线性相关系数为 0.999 5。方法的定性检出限为 6 $\mu\text{g/kg}$,定量检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。高、中、低 3 个浓度水平的加标回收率为 96.8% ~ 97.4%,相对标准偏差小于 10%。

关键词 :液相色谱-电喷雾质谱/质谱;丙烯酰胺;同位素;高温烹制淀粉类食品

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)03-0289-03

Determination of Acrylamide in Heated Starchy Food by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

ZHAO Rong¹, SHAO Bing¹, ZHAO Jie¹, WU Yongning², WU Guohua¹, XUE Ying¹

(1. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China ; 2. National Institute of Nutrition and Food Safety, China Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100025, China)

Abstract : An isotope dilution liquid chromatographic-electrospray ionization tandem mass spectrometric method has been established for the determination of acrylamide in heated starchy food with a C₁₈ analytical column and methanol-water containing 0.1% formic acid (2:98, v/v) as mobile phases. The clean-up of samples was performed on an Oasis HLB solid phase extraction cartridge. The calibration curve of acrylamide showed good linearity in the range of 10 – 500 $\mu\text{g/L}$ with correlation coefficient of 0.999 5. The detection limit of the method was 6 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N = 3$), and the limit of quantification was 20 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N = 10$). The average recoveries at three levels ranged from 96.8% to 97.4% ($n = 5$), and the relative standard derivations were lower than 10%.

Key words : liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry ; acrylamide ; isotope ; heated starchy food

丙烯酰胺是一种化学合成物质,是合成高分子材料聚丙烯酰胺的单体,后者主要用于水处理、化妆品和包装材料。1994 年国际癌症研究机构(IARC)将丙烯酰胺列为可能使人类致癌的物质^[1]。以前,科学家们普遍认为饮用水、烟草是人体接触丙烯酰胺的主要来源。2001 年, Tareke 等^[2]的研究表明,很多食物如炸薯条、炸土豆片、面包和高温烹制的高碳水化合物中含有高含量的丙烯酰胺。2002 年瑞典国家食品管理局(NFA)确认了这一结果^[3,4];世界卫生组织(WHO)于 2002 年 6 月紧急召开专家委员会会议,对其进行了评估^[5]。各国的食品监管部门也进行了广

泛的调查。Mottram 等^[6]的研究表明,在某些食物烹制过程中,天冬氨酸和糖一起加热到 100 $^{\circ}\text{C}$ 以上时发生美拉德反应,即可生成丙烯酰胺。

国际上主要采用气相色谱与质谱联用技术^[2,7]以及液相色谱与质谱联用技术^[2,7,8]测定丙烯酰胺。其中采用气相色谱-质谱/质谱法的样品前处理较为繁琐且需要衍生化。采用液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)简单、快捷,但在我国还未见相关方法的报道。我国是淀粉类食品的消费大国,建立切实可行的丙烯酰胺分析方法,并开展相关的研究是十分必要的。

收稿日期 2004-05-23

作者简介 :赵 榕,女,主管技师,主要从事食品污染物研究。

通讯联系人 :邵 兵,博士,副研究员, Tel (010)64212461-503, Fax (010)64214405, E-mail :shaob@bjcdc.org.

基金项目 :国家“十五”攻关项目(2002BA804A19)和国家自然科学基金资助项目(30371220)。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

液相色谱-质谱/质谱联用仪:配有 Waters-2695 型高效液相色谱仪, Micromass® -Quattro Ultra™ PT 质谱检测器, Sigma 3-15 型离心机。

甲醇(色谱纯, Fisher 公司); 甲酸(99%, Aseisen Saesure Acros Organics); 丙烯酰胺标准品(东京化成工业株式会社); $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准品(用甲醇配成 1.0 g/L 的标准储备液, Cambridge Isotope Laboratories 英国); 试验用水均为超纯水; 高纯氮气; HLB 固相萃取小柱(6 mL(200 mg), Waters 公司)。

丙烯酰胺标准储备液的配制:准确称取 0.010 0 g 丙烯酰胺标准品于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 0.1% (体积分数) 的甲酸水溶液溶解并定容。此溶液质量浓度为 1.0 g/L (每两周配制一次)。

$^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标溶液的配制:取 20 μL 1.0 g/L 的 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 此溶液的质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 。

系列标准溶液的配制:用丙烯酰胺标准储备液配制质量浓度分别为 10, 20, 50, 80, 100 $\mu\text{g/L}$ 且含 20 $\mu\text{g/L}$ $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标物的系列标准溶液。

1.2 分析条件

1.2.1 液相色谱条件

色谱柱:Waters 公司 Atlantis 色谱柱(5 μm , 2.1 mm i. d. $\times$ 150 mm); 流动相 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(体积比为 98:2); 流速 0.2 mL/min; 柱温 26 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 20 μL 。

1.2.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI(+)); 毛细管电压:3.5 kV; 锥孔电压:40 V; 射频透镜 1(RF Lens 1)的电压:30.8 V; 离子源温度:80 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度:300 $^{\circ}\text{C}$; 离子碰撞能量 6 eV。

1.3 样品处理

取 1.0 g 磨碎样品于 30 mL 离心管中, 准确加入 0.1 mL 200 $\mu\text{g/L}$ $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标溶液, 氮气吹干。加入 5 mL 重蒸石油醚, 振荡 10 min, 弃去石油醚层; 再加入 5 mL 重蒸石油醚, 振荡 10 min, 弃去石油醚层后用氮气吹干。加入 8 mL 水, 振荡提取 20 min, 在 10 000 r/min 速率下离心 10 min, 转移上清液。残渣中加入 7 mL 水, 振荡提取 20 min, 再于 10 000 r/min 速率下离心 10 min, 合并上清液。HLB 柱用 3 mL 甲醇清洗, 再用 3 mL 水平衡; 取 1.5 mL 提取液上样, 用 4 mL 80% (体积分数) 甲醇水溶液洗脱, 收集洗脱液, 用氮气吹至近干, 用 0.1% 的甲酸水溶液定容至 1.0 mL, 上机测定。

1.4 定性及定量

分别选择 m/z 72 $\rightarrow$ 55 和 m/z 75 $\rightarrow$ 58 作为样品和内标的定量离子, 以样品 m/z 72 $\rightarrow$ 55 和内标 m/z 75 $\rightarrow$ 58 的峰面积比与丙烯酰胺的质量浓度作标准曲线。以保留时间和各对离子的响应强度的比例作为定性标准。实际样品中各对离子的强度比不超过标准样品溶液的 $\pm 20\%$ 。样品中丙烯酰胺的含量 α ($\mu\text{g/kg}$) 按下式计算:

$$C = \frac{c \times V}{f \times W}$$

c :测得的丙烯酰胺质量浓度, $\mu\text{g/L}$; W :样品质量, kg; V :提取溶剂的体积, L; f :浓缩倍数。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱条件的优化

丙烯酰胺分子具有较强的极性, 因此在一般反相色谱柱上, 即使以 100% 的水作流动相, 其保留时间也很短, 因此我们选择了可以使用全水作流动相的 Atlantis 色谱柱。但有机相含量过低会造成峰变宽, 给丙烯酰胺的定性及定量造成一定的困难, 因此, 我们确定以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(体积比为 98:2)作流动相, 此时其保留时间大约为 4.06 min。为了提高丙烯酰胺的电离能力, 在流动相的水相中加入了体积分数为 0.1% 的甲酸。

2.2 质谱条件的优化

根据丙烯酰胺的分子结构的特征, 我们选择了 ESI(+) 作为电离模式。通过流动注射直接进样, 对毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度、脱溶剂气流量、RF Lens 1、质谱分辨率等条件进行了优化, 确定毛细管电压为 3.5 kV; 锥孔电压为 40 V; RF Lens 1 电压为 30.8 V; 离子源温度为 80 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度为 300 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流量:350 L/h。图 1 为丙烯酰胺的标准样品和 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标物的 LC-MS/MS 色谱图。

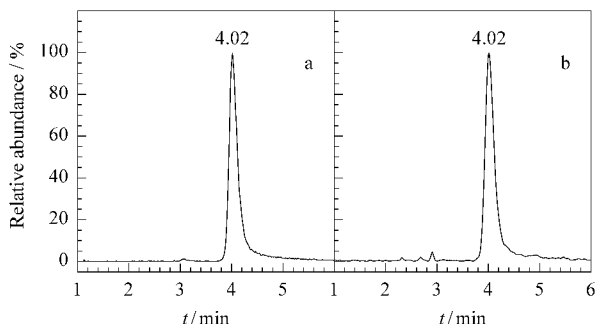


图 1 丙烯酰胺(a)和 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标物(b)的 LC-MS/MS 谱图

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of acrylamide (a) and $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide as internal standard (b)

在以上条件下 ,我们对碰撞能量进行优化时发现 ,在碰撞能量为 6 eV 时 m/z 55 的碎片离子的响应最高 ,而没有发现其他的碎片 ;当升高碰撞能量为 25 eV 时 ,丙烯酰胺分子离子峰产生 m/z 55 ,44 的碎片 ,准分子离子峰丰度为 100%。其中 m/z 55 的碎片离子相应于丙烯酰胺失去一个 NH_3 ,而 m/z 44 的碎片离子相应于丙烯酰胺失去一个乙烯分子。与丙烯酰胺类似 ,在碰撞能量为 6 eV 时 ,内标物质 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺产生 m/z 58 的碎片 ;在碰撞能量为 25 eV 时 ,则产生 m/z 58 ,45 的碎片。图 2 为丙烯酰胺及同位素内标物 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺在碰撞能量为 25 eV 时的质谱图。

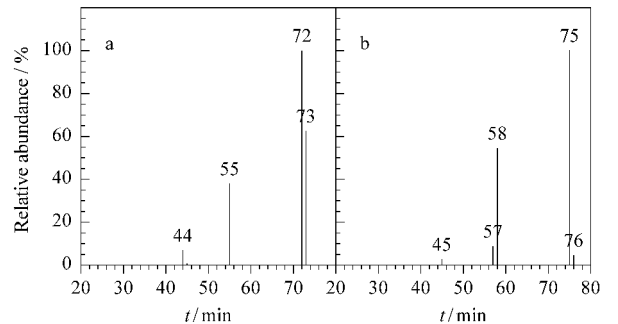


图 2 碰撞能量为 25 eV 时丙烯酰胺(a)及同位素内标物 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺的质谱图

Fig.2 Mass spectra of acrylamide (a) and $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide as internal standard (b) at the collision energy of 25 eV

2.3 样品制备方法的选择

提取溶剂的选择 :称取 1 g 玉米粉作为空白本底 ,加入丙烯酰胺标准品 500 ng ,分别用水、2 mol/L NaCl 溶液、乙腈、甲醇及丙酮等 5 种提取溶剂各 10 mL 振荡提取 20 min ,取上清液上机测定。结果表明 ,以水为提取溶剂时的回收率最高。

固相萃取柱的选择 :丙烯酰胺分子极性较强 ,所采用的提取溶剂为水溶液 ,因此选择了对极性物质具有较强吸附能力的 HLB 固相萃取小柱。分别对 3 mL(60 mg)、6 mL(200 mg)以及 6 mL(500 mg)规格的 HLB 小柱进行试验。试验结果表明 :3 mL (60 mg)小柱柱容量小 ,不能完全吸附提取液中的丙烯酰胺 ;6 mL(500 mg)小柱柱容量过大 ,洗脱时所需洗脱溶剂多。因此 ,选择了既可完全吸附提取液中的丙烯酰胺 ,又能较容易被洗脱的 6 mL(200 mg) HLB 小柱。

洗脱剂的选择 :分别对 4 种洗脱剂(水、甲醇-水 (体积比为 1:1)、甲醇-水(体积比为 8:2)以及纯甲醇)的洗脱能力进行了试验 ,结果见表 1。其中 ,甲醇-水(体积比为 8:2)可将丙烯酰胺完全洗脱 ,试剂用量最少 ,并且较易浓缩。因此确定以甲醇-水(体

表 1 不同溶液洗脱能力的比较

Table 1 Eluting efficiency of different solvents

Eluent	Volume/mL	Recovery/%
Water	2.5	100
Methanol-water (1:1 , v/v)	2.0	97
Methanol-water (8:2 , v/v)	1.0	100
Methanol	3.0	87

积比为 8:2)作为洗脱剂。

2.4 检出限、精密度、回收率及线性范围

在上述条件下 ,以内标法定量 ,丙烯酰胺质量浓度 X 为 10 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 时 ,与峰面积 Y 有良好的线性关系 ,线性方程为 $Y = 0.11856X - 0.400612$,线性相关系数为 0.9995。方法的定性检出限为 6 $\mu\text{g/kg}$,定量检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。

称取 1 g 玉米粉加入 10% 植物油作为本底 ,分别加入 200 ,500 ,800 ng 丙烯酰胺标准品 ,进行加标回收试验 ,结果见表 2。高、中、低 3 个浓度水平下的加标回收率为 96.8% ~ 97.4% ,相对标准偏差 (RSD)小于 10%。

表 2 方法精密度及回收率($n = 5$)

Table 2 Precisions and recoveries at three levels ($n = 5$)

Original/ ($\mu\text{g/kg}$)	Added/ ($\mu\text{g/kg}$)	Found/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/ %	RSD/ %
0	200	194	96.8	9.9
0	500	484	97.2	9.5
0	800	778	97.4	6.2

2.5 实际样品的测定

应用上述方法 ,对市售的 61 种高温烹制的淀粉类食品样品进行了检测。其中 29 种薯片中丙烯酰胺的含量为 0 ~ 3 200 $\mu\text{g/kg}$,20 种小食品中丙烯酰胺的含量为 0 ~ 659 $\mu\text{g/kg}$,12 种锅巴中丙烯酰胺的含量为 0 ~ 370 $\mu\text{g/kg}$ 。

参考文献 :

[1] International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans , 1994 , 60 : 389

[2] Tareke E , Rydberg P , Karlsson P , Eriksson S , Törnqvist M. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 2002 , 50 (17) : 4998

[3] Leif Busk. Press Release from Livsmedelsverket , Swedish National Food Admonistration. <http://www.slv.se>. April 24 , 2002

[4] Karl-Erik Hellenäs , Johan Rosén. Swedish National Food Administration. <http://www.slv.se>. April 26 , 2002

[5] FAO/WHO. Health implication of acrylamide in food. Report of a Joint FAO/ WHO Consultation. World Health Organization Geneva. <http://www.Who.int/fsf/acrylamide/SummaryReportFinal.pdf>. 25-27 June 2002

[6] Mottram D S , Wedzicha B L , Dodson A T. Nature , 2002 , 419 : 448

[7] Ahn J S , Castle L , Clarke D B , Lloyd A S , Philo M R , Speck D R. Food Additives and Contaminants , 2002 , 19 (12) : 1116

[8] Svensson K , Abramsson L , Becker W , Glynn A , Hellenas K E , Lind Y , Rosen J. Food and Chemical Toxicology , 2003 , 41 (11) : 1581