

HPLC-MS/MS 测定油炸及高温烘烤食品中的丙烯酰胺

张 珩¹ 张 琦² 栾 燕² 马金波² 权伍英² 吴永宁¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050;

2. 沈阳市疾病预防控制中心,辽宁 沈阳 110031)

摘要:为检测食品中的丙烯酰胺,建立了饼干、面包、油条、薯片、咖啡多种食品中丙烯酰胺的测定方法。试样经水溶液振荡提取,硅藻土柱净化,采用 HPLC-MS/MS 和同位素稀释定量技术,以选择反应监测(SRM)方式测定目标化合物。方法的检出限和定量限分别为 4 μg/kg 和 12 μg/kg,线性范围 10~3 000 μg/L,不同食品基质的不同加标水平(20~2 000 μg/kg)的回收率为 90%~105%,RSD<10%。本方法定量准确、可靠,适用于食品中丙烯酰胺的测定。
关键词:丙烯酰胺;同位素稀释技术;色谱法;高压液相

Determination of Acrylamide in Fried or Roasted Foods by HPLC-MS/MS

ZHANG Gong, ZHANG Qi, LUAN Yan, MA Jin-bo, QUAN Wu-ying, Wu Yong-ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: A method for determination of acrylamide in foods such as chips, crisps, coffee and some other fried or baked starch-rich foods was developed. After adding ¹³C₃ labeled acrylamide the sample was extracted by water and then cleaned-up by Extrelut™ 20. Finally the extract was analyzed by HPLC-MS/MS in SRM mode. LOD (limit of detection) and LOQ (limit of quantitation) were 4 μg/kg and 12 μg/kg respectively. Average recoveries for different matrices were 90%~105% with RSD<10%. The results showed that the method was suitable for determination of acrylamide in chips, crisps, coffee and some other fried or baked starch-rich food.

Key word: Acrylamide; Chromatography, High Pressure Liquid

丙烯酰胺(acrylamide,AA)是具有遗传毒性的致癌物,并能引起神经损伤。2002年4月瑞典国家食品管理局(NFA)及瑞典斯德哥尔摩大学的研究人员率先报道,多种食品尤其是淀粉类食品在高温加工过程中产生 AA^[1,2]。此后该问题引起了国际社会的高度重视,世界卫生组织/联合国粮农组织(WHO/FAO)把食品中的丙烯酰胺作为优先评估对象^[3]。在2005年2月第64次食品添加剂联合委员会(JECFA)会议上,首次公布了23个国家提供的暴露评估数据,指出其暴露边界(Margin of Exposure, MOE)在100以内,成为在危险性管理中需要优先控制的食物污染物。为有效评价我国食品中AA污染状况及人群膳食中AA的暴露水平,迫切需要建立准确、可靠的测定食品中AA的方法。目前,测定食品中AA的方法主要有GC-MS^[4~8]和HPLC-MS/MS^[9~12],此外还有GC-ECD、GC-FID、GC-MS/MS、HPLC-UV、HPLC-MS等。美国FDA发布了采用

HPLC-MS/MS,以¹³C₃-AA为内标的同位素稀释技术测定食品中AA的方法^[9,10],尽管该方法因灵敏度高而成为各国建立方法的参考依据,但针对多种介质的净化效果尚待评价。本文在其技术基础上,采用硅藻土净化方法发展了适合我国国情的食品中HPLC-MS/MS测定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和设备 Surveyor 高效液相色谱(Thermo Finnigan);TSQ Discovery 型三重四极杆串联质谱仪(Thermo Finnigan);色谱柱:Diamonsil™ C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, Dikma公司);预柱:C₁₈保护柱(4.6 mm×3.0 mm I.D. Dikma公司);玻璃层析柱(1.8 cm×30 cm)

1.2 材料和试剂 标准品AA纯度>99.8%(Fluka),¹³C₃-AA美国Cambridge Isotope Laboratories;Extrelut™ 20(Merck);甲酸分析纯;甲醇 色谱纯, J&TBAKER;正己烷、乙酸乙酯分析纯(重蒸后使用);硫酸铵和无水硫酸钠分析纯。

1.3 标准品配制 AA标准储备液 准确称取0.1000 g AA标准品于10 ml棕色容量瓶中,用甲醇

基金项目:国家自然科学基金(30371220);国家科技重大专项《食品安全关键技术》重要有机污染物的痕量和超痕量检测技术(2001BA804A19和2001BA804A45)

作者简介:张珩 男 博士生

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

溶解并定容 (10.00 g/L), -20 °C 保存。 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标溶液 准确称取 0.010 g $^{13}\text{C}_3$ -AA 标准品于 10 ml 棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容,(1.000 g/L), -20 °C 保存。标准系列溶液 吸取 AA 以及 $^{13}\text{C}_3$ -AA 储备液,用超纯水稀释,配置系列标准溶液,含内标 100 $\mu\text{g/L}$,含 AA 分别为 10、50、100、500、1 000、3 000 $\mu\text{g/L}$ 。

1.4 试样处理

1.4.1 试样提取 取约 50 g 试样,经粉碎机粉碎,-20 °C 冷冻保存。准确称取试样 2.00 g,加入 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标 20 μl (10 mg/L),加超纯水 20 g,振荡 30 min,于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,并在上清液中加入硫酸铵 15 g,振荡 10 min,使充分溶解,于 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液 10 g,备用。如上清液不足 10 g,则用饱和硫酸铵溶液补足。

1.4.2 试样净化 取洁净玻璃层析柱,填少许玻璃棉,压紧,依次填装无水硫酸钠 10 g、硅藻土 2 g。称取 5 g 硅藻土与上述备用的试样上清液搅拌均匀后,装入层析柱中。用正己烷 60 ml 淋洗脱油脂,控制流速 2 ml/min,弃去淋洗液。用 60 ml 乙酸乙酯洗脱,控制流速 2 ml/min,收集溶液,并在 45 °C 水浴下减压旋转蒸发至近干,用乙酸乙酯洗涤蒸发瓶 3 次(每次 1 ml),将试样浓缩液转移至已加入 1 ml 超纯水的试管中,涡旋振荡。在氮气流下吹去上层有机相后,加入 1 ml 正己烷,涡旋振荡、混匀,于 3 500 r/min 离心 5 min,取下层水相过 0.22 μm 水相滤膜,备用。

1.5 测定

1.5.1 色谱条件 流动相:甲醇+甲酸+水(10+0.1+90);流速:0.4 ml/min;进样体积:20 μl ;分析时间:4~9 min。

1.5.2 质谱条件 以定量离子 72 > 55 的响应最优为指标,进行质谱条件的优化离子源:阳离子电喷雾电离源(ESI+);喷雾电压:3 800 V;加热毛细管温度:350 °C;鞘气(N_2):20 Arb;辅助气(N_2):10 Arb;扫描方式:选择反应监测(SRM);源内诱导解离电压(CID):10 V;Q2 碰撞气压(Ar):1.2 mTorr;Q2 碰撞能量:24 V;扫描时间:0.4 s。

监测离子 AA 母离子 m/z 72,子离子 m/z 44、m/z 55; $^{13}\text{C}_3$ -AA 母离子 m/z 75,子离子 m/z 45、m/z 58。

定量离子 AA m/z 55 和 $^{13}\text{C}_3$ -AA m/z 58。

1.5.3 测定 取试样溶液 20 μl 注入液相色谱-质谱/质谱系统。记录 AA 和 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标的峰面积。计算 AA (m/z 55) 和 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标 (m/z 58) 的峰面积比,以各系列标准溶液的进样量 (ng) 与对应的 AA (m/z 55) 和 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标 (m/z 58) 的峰面积比进行线

性回归计算,得出线性方程。

1.5.4 计算 按下式用内标法计算试样中 AA 的含量。

$$X = \frac{A \times m_3}{m_1 \times m_2}$$

X 试样中 AA 含量, $\mu\text{g/kg}$; A 试样色谱峰与 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标色谱峰的峰面积比值对应的 AA 质量, ng; m_1 取样量, g; m_2 标准溶液中 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标的质量, ng; m_3 试样中 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标的质量, ng。计算结果保留 3 位有效数字。

2 结果和讨论

2.1 标准系列实验线性范围 以标准系列溶液进样,记录 AA 和 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标的峰面积,以 AA 和 $^{13}\text{C}_3$ -AA 内标的峰面积比 (m/z 55/58) 和对应的标准溶液中 AA 的质量进行线性回归计算,得线性方程 $y = 0.0064x + 0.01$,相关系数 $R^2 = 0.9996$ 。重复线性实验, $R^2 = 0.9992$ 。结果表明:在 10 到 3 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内,线性相关性良好;而且该范围基本覆盖了食品中 AA 的含量。

2.2 定性和定量离子确定 由于 AA 分子量仅为 71,尽管采用 MS/MS 监测,但在测定中还是可能存在干扰组分,为确保 AA 定性结果准确、可靠,采用多离子监测。以 72 > 55 和 75 > 58 作为 AA 及 $^{13}\text{C}_3$ -AA 的定量离子,选用 72 > 72、55 和 44 3 个离子作为 AA 的定性识别离子,在给定的质谱条件下标准溶液丰度分别为 100%、21% \pm 4% 和 23% \pm 3%,舍弃了丰度在 10% 以下的 54 和 27,要求试样测定中 3 个离子的丰度比与标准溶液比较误差 \leq 20%。以薯片为例,其 AA 以及 $^{13}\text{C}_3$ -AA 的色谱图和质谱图分别见图 1、图 2。AA 母离子 m/z 72 ($[\text{M} + \text{H}]^+$),经碰撞产生子离子 m/z 54 ($[\text{H}_2\text{C} = \text{CHC} = \text{NH}]^+$), 55 ($[\text{H}_2\text{C} = \text{CHC} = \text{O}]^+$) 及更小的 m/z 44 ($[\text{H}_2\text{N} - \text{C} = \text{O}]^+$) 和 m/z 27 ($[\text{H}_2\text{C} = \text{CH}]^+$)。Ono^[11]等选用 72 > 55 和 75 > 58 作为 AA 的定性、定量离子,Rosen^[12]等选用 72 > 55 和 75 > 58 作为 AA 的定量离子,选用 72 > 72、55、54 和 27 4 个离子进行定性;Andrzejewski^[9]选用 72 > 55 和 75 > 58 作为 AA 的定量离子,选用 72 > 72、55 和 27 3 个离子进行定性。本研究的定量离子与其它相关研究结果一致,但 54 和 27 的离子丰度太低在本研究中难以符合确证离子的要求未被采纳。

2.3 试样制备条件的优化

2.3.1 提取 本方法采用目标化合物溶解度最大的水作为提取溶剂,试样与水的比例为 1:10,这是目前 AA 测定中应用最广泛的提取方法。离心之后,加硫酸铵使溶液饱和以沉淀蛋白质,有利于净

化、洗脱。

2.3.2 硅藻土净化柱的洗脱曲线 取 10 g 饱和硫酸铵加入 AA 标准品 1 μg,按照 1.4.2 方法装柱,用正己烷 60 ml 淋洗控制流速 2 ml/min,收集淋洗液,再用 150 ml 乙酸乙酯洗脱,控制流速 2 ml/min,按 50 ml 进行分段流分收集。在每个流分中加入 ¹³C₃-AA 内标 10 μl(1 000 μg/L),45 °C 水浴中减压旋转蒸发至尽干,按照 1.4.2 方法操作,并按 1.5 测定。各流分中 AA 含量及其比例见表 1。结果可见,使用 60 ml 正己烷淋洗基本不会损失 AA,采用乙酸乙酯洗脱目标化合物,洗脱体积在 50 ml 时回收率超过 85%,100 ml 基本洗脱完全。由于采用同位素稀释技术,克服了测定的系统误差,为了更好地减少试样基质的干扰,选择 60 ml 的乙酸乙酯进行洗脱。

2.3.3 硅藻土柱的脱脂实验 取 10 g 饱和硫酸铵,加入植物油 0.536 g 代替试样,按照 1.4.2 方法装柱,用正己烷淋洗,控制流速 2 ml/min,分别收集 40、20 和 20 ml;将 3 个流分旋转蒸发至近干,转移至已准确称量的试管,用氮气吹干,再分别称重,计算油脂的残留量。各流分中油脂含量及其比例见表 2。结果可见使用 40 ml 正己烷淋洗基可以除去 98% 的油脂,60 ml 正己烷淋洗基本除去加入的植物油成分。而在实际样品中,使用水作为提取溶液,提取液中油脂的含量远没有 0.5 g,故选择 60 ml 正己烷淋

洗脱油脂。

表 1 硅藻土柱的洗脱效果

流分	AA 含量(ng)	回收率(%)
正己烷(60 ml)	ND	0.0
乙酸乙酯流分 1(50 ml)	858	85.8
乙酸乙酯流分 2(50 ml)	95	9.5
乙酸乙酯流分 3(50 ml)	8	0.8

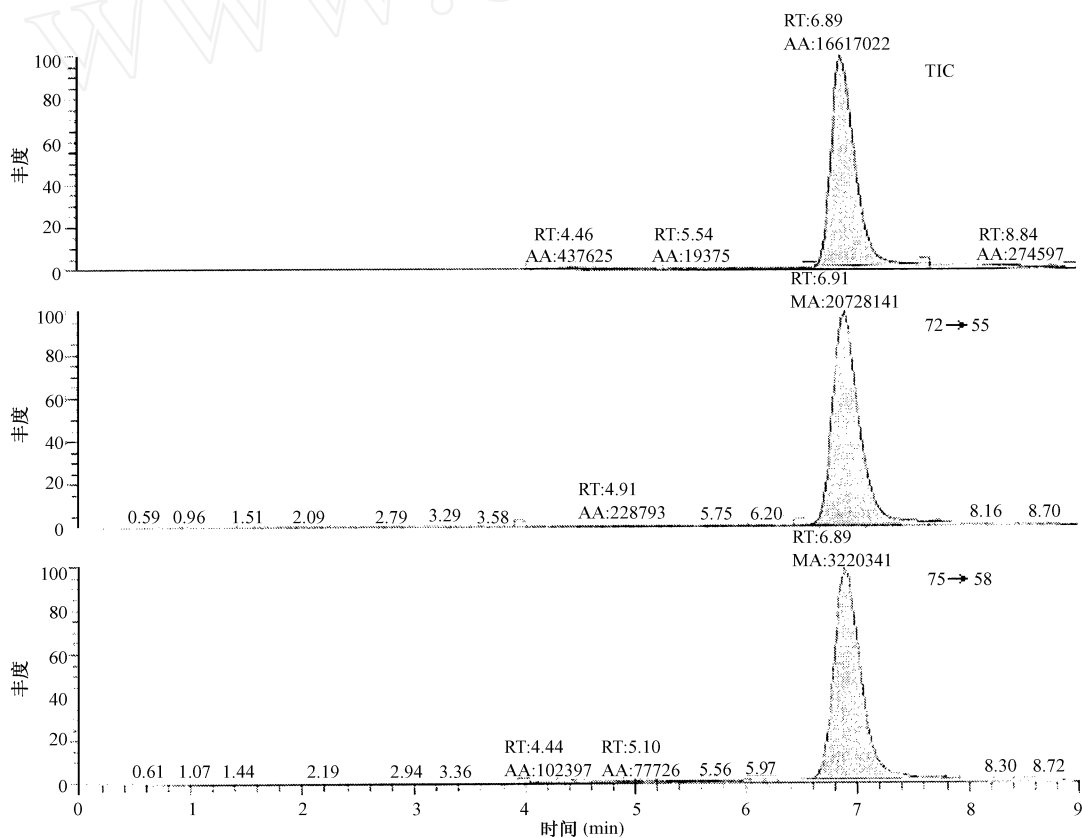
注:ND 表示未检出

表 2 硅藻土柱脱油的淋洗效果

流分	油重(g)	回收率(%)
正己烷 1(40 ml)	0.527	98.3
正己烷 2(20 ml)	0.008	1.5
正己烷 3(20 ml)	0.003	0.6

2.3.4 实际试样测定 采用上述试样的提取、净化方法处理薯片试样,用 HP LC-MS/MS 测定的色谱图和质谱图分别见图 1、图 2。由图中可见,AA 保留时间周围没有基质干扰,目标化合物的色谱峰峰型对称、尖锐,且 AA 的质谱图上,3 个定性离子 m/z 72、m/z 44 和 m/z 55 丰度稳定。

2.4 准确度和精密度实验 选择油饼、饼干和薯条 3 种不同样品基质,分别加入 AA 和内标。各加标水平测定 6 次,作精密度实验。以回收率衡量方法的准确度,以 RSD 作为方法的精密度,结果见表 3、表 4、表 5。



从上至下依次为总离子流图(TIC),丙烯酰胺选择离子流图(72 → 55)和同位素内标¹³C₃-丙烯酰胺选择离子流图(72 → 55)

图 1 薯片中丙烯酰胺及其同位素内标¹³C₃-丙烯酰胺的色谱图

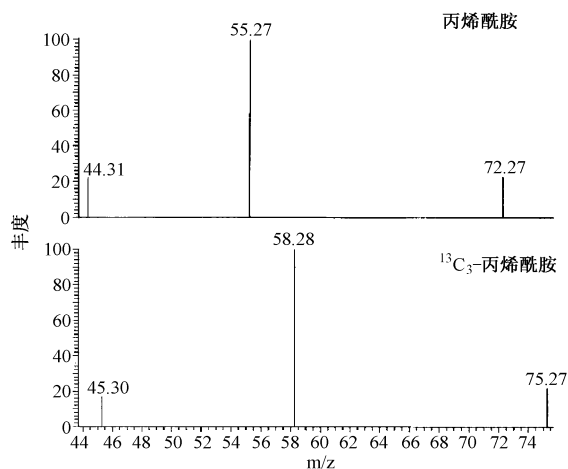


图2 薯片中丙烯酰胺及其同位素内标¹³C₃-丙烯酰胺的质谱图

表3 油饼的加标回收结果

加标水平 (μg/kg)	加标前含量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
20	14	32	90.0	6.0
200	14	207	96.5	3.3
2000	14	2091	103.9	1.8

表4 薯条的加标回收结果

加标水平 (μg/kg)	加标前含量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
250	202	454	101.0	5.2
1000	202	1207	100.5	2.4

表5 巧克力饼干的加标回收结果

加标水平 (μg/kg)	加标前含量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
500	343	827	97.2	3.0
1000	343	1370	102.7	2.8

2.5 方法的检出限和定量限 方法的检出限和定量限(LOQ)是衡量方法灵敏度的指标,即在规定的实验条件下方法能够定性检出和定量测定的最小能力。本方法根据对基质空白的测定,确定电噪声和化学噪声水平,以3倍噪声峰高对应的浓度作为检出限(LOD),以10倍噪声峰高对应的浓度作为定量限。根据实验得到该方法的LOD为4 μg/kg,LOQ为12 μg/kg。

2.6 样品测定 采用建立的方法对市售的20种油炸及高温加工的食品样品进行了含量测定,结果见表6。

由样品测定的结果可见,各类食品的污染水平各异,含量与样品原料、加工工艺等因素相关。未经高温加工的淀粉类食品中丙烯酰胺的含量较低(方便粥中未检出);经过高温加工的淀粉类食品中AA的含量也各有不同,以小麦、淀粉为主经短时间高温加工的食品,如油条、油饼、麻花、方便面饼等含量在

表6 样品中AA测定结果 μg/kg

样品名称	含量	样品名称	含量
方便粥	ND	油饼	14
油条	90	方便面	38
麻花	44	米脆	587
巧克力饼干	347	饼干	184
薯条(1)	203	薯条(2)	811
薯片(1)	1002	薯片(2)	564
薯片(3)	1445	薯片(4)	951
薯片(番茄味)(5)	841	薯片(原味)(6)	998
薯卷	1665	大麦茶	506
玉米茶	269	速溶咖啡	325

注:ND为未检出

100 μg/kg以下。加工温度高、时间长、表面积/重量大的小麦、大米、玉米淀粉食品,如米脆、大麦茶、玉米茶等中含量较高(200~600 μg/kg)。以马铃薯淀粉为主,经过高温加工的食品含量最高,有的高达1600 μg/kg。测定结果与GEMS/Food数据库收集的数据比较,同类食品中AA的含量相当^[3]。马铃薯淀粉中富含天冬氨酸,而天冬氨酸是形成AA的重要前体,这可以解释薯片和薯条中AA含量远高于小麦、大米、玉米等其它淀粉类食品的原因。

参考文献

- [1] WHO. FAO/WHO consultation on the health implications of acrylamide in food[Z]. Summary Report of a meeting held. Geneva, 2002—06—25-27.
- [2] Swedish National Food Administration (SNEA). Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuffs. Press release from Livsmedelsverket [Z]. 2002—04—24.
- [3] FAO/WHO. 64th Joint fao/who expert committee on food additives Rome[Z]. 2005—02—8-17.
- [4] Nemoto S, Takatsuki S, Sasaki K. Determination of acrylamide in food by GC-MS using ¹³C₃-labeled acrylamide as a internal standard[J]. J Food Hyg Soc Jpn, 2002, 43: 371-376.
- [5] Castle L J. Determination of acrylamide monomer in mushroom grown on polyacrylamide gel [J]. Agric Food Chem, 1993, 41: 1261-1263.
- [6] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Acrylamide: a cooking carcinogen? [J]. Chem Res Toxicol, 2000, 13: 517-522.
- [7] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs[J] J Agric Food Chem, 2002, 51: 4998-5006.
- [8] Castle L, Campos M, Gilbert J. Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Sci Food Agric, 1991, 54: 549-555.

广东省酱油生产企业现状及监管对策研究

张永慧¹ 陈卫东¹ 黄伟雄² 陈慧¹ 池岚¹ 何洁仪³

(1. 广东省卫生监督所, 广东 广州 510300; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东 广州 510300;

3. 广州市疾病预防控制中心, 广东 广州 510080)

摘要: 为了解广东省酱油生产企业卫生状况, 对全省 312 家酱油生产企业进行了卫生学调查, 抽查产品 108 份。调查结果显示酱油生产企业卫生状况呈现两极分化及地区不平衡状况。抽检产品按 GB 2717—2003《酱油卫生标准》评价, 合格率为 89.8%, 但氯丙醇指标仅有 40% 符合欧盟 1998 年 FAC 规定的标准, 表明其污染问题需引起注意。结果显示, 应尽快修订《调味品卫生管理办法》及相关标准规范, 将酸水解植物蛋白调味液列入食品添加剂管理; 加强对氯丙醇的监测工作和中小型调味品生产企业的监督管理; 推行 HACCP 管理模式, 实行行业的规范化管理等监管对策。

关键词: 调味品; 卫生调查; 卫生状况; 安全措施

Situation and Supervisory Strategy of Soy Sauce Industry in Guangdong Province

ZHANG Yong-hui, CHEN Wei-dong, HUANG Wei-xiong, CHEN Hui, CHI Lan, HE Jie-yi

(Guangdong Provincial Institute of Health Inspection, Guangdong Guangzhou 510300, China)

Abstract: 312 soy sauce factories in Guangdong Province were investigated to know about their sanitary situation and 108 samples of their products were collected for examination. Results showed that the situation of soy sauce factories was polarized in different areas. Rate of qualified soy sauce product according to 'Hygiene Standard of Soy Sauce' (GB 2717—2003) was 89.8%. However, only 40% products measured up to the standard of 3-MCPD issued in 1998 by FAC in EU areas. The study indicated that soy sauce product was generally in good quality, but the problem of 3-MCPD contamination in soy sauce should also be focused on. Therefore, it is suggested that the 'Measures for the Administration of the Hygiene of the Condiment' and the associated standards be revised as soon as possible, and HVP be included into the supervisions of food additives. Meanwhile, standard HACCP management of soy sauce industry should be put into practice and 3-MCPD surveillance and supervision for small and medium size soy sauce factories be reinforced.

Key word: Condiments; Health Surveys; Health Status; Security Measures

酱油是我国传统的重要调味食品之一, 广东省是全国酱油生产和消费大省, 2002 年产量近 50 万 t, 年出口量约 4.5 万 t, 分别约占全国酱油年生产总量的 10% 及年出口总量的 50%^[1], 2003 年产量近 60

万 t, 约占全国的 35%, 比 2002 年增长 21%^[2], 以一批全国知名酱油品牌为代表的广式酱油已风靡全国并走向世界, 广东省酱油生产企业现状在很大程度上能反映我国酱油行业的现状。但近几年的“氯丙

[9] Denis Andrzejewski, John A G Roach, Martha L Gay, et al. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 1996-2002.

of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese food[J]. Food Additi Contam, 2003, 20: 215-220.

[10] John A G Roach, Denis Andrzejewski, Martha L Gay, et al. Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51: 7547-7554.

[12] Rosen J, Hellenas k. Analysis of acrylamide in cooked food by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analyst, 2002, 127: 880-882.

[11] Ono H, Chuda M, Ohmishi- Kameyama H, et al. Analysis

[收稿日期: 2005-08-19]

中图分类号: R15; O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2006)01-0005-05

基金项目: 国家科技攻关计划(2001BA804A09); 广东省十五科技计划项目(2002C31201)

作者简介: 张永慧 男 主任医师

通讯作者: 陈卫东 男 主任医师

广东省酱油生产企业现状及监管对策研究 —— 张永慧 陈卫东 黄伟雄等