

# SPE-HPLC-ESI-MS-MS测定常见焙烤及油炸食品中丙烯酰胺的含量

李双宜<sup>1</sup>, 李 蓉<sup>1,\*</sup>, 张朋杰<sup>1</sup>, 邱 霞<sup>1</sup>, 李向丽<sup>2</sup>

(1.中山出入境检验检疫局, 广东 中山 528403; 2.中山火炬职业技术学院, 广东 中山 528436)

**摘 要:** 目的: 建立一种焙烤和油炸食品中丙烯酰胺的固相萃取-高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱检测方法。方法: 样品用水提取, Cleanert SLE固相萃取柱净化, 高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱测定, 内标法定量。结果: 在0.01~3.00 mg/L范围内, 线性相关系数大于0.998, 方法的检出限为1.0 µg/kg。在3个添加量(10、100、1 000 µg/kg)的平均回收率为96.8%, 相对标准偏差为2.7%。结论: 该方法简便、准确、稳定, 已实际应用于测定焙烤和油炸食品中丙烯酰胺的含量。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱; 焙烤和油炸食品; 丙烯酰胺

Detection of Acrylamide in Baked and Fried Foods by HPLC-ESI-MS-MS with SPE Column Cleanup

LI shuangyi<sup>1</sup>, LI Rong<sup>1,\*</sup>, ZHANG Pengjie<sup>1</sup>, QIU Xia<sup>1</sup>, LI Xiangli<sup>2</sup>

(1. Zhongshan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhongshan 528403, China;

2. Zhongshan Torch Polytechnic, Zhongshan 528436, China)

**Abstract:** Purpose: To develop a method for the determination of acrylamide in baked and fried foods using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS-MS) with solid phase extraction (SPE) column cleanup. Methods: Acrylamide was extracted from samples with water and the extract was cleaned up by Cleanert SLE-SPE column. The analyte was quantified by an internal standard method. Results: The proposed calibration curve was linear in the range of 0.01–3.00 mg/L with a correlation coefficient greater than 0.998. The limit of detection (LOD) was 1.0 µg/kg. The average recovery at three spiked levels (10, 100 and 1 000 µg/kg) was 96.8% with RSD smaller than 2.7%. Conclusion: The developed method was applied successfully to determine acrylamide in baked and fried foods samples with the advantages of simplicity, high accuracy and good stability.

**Key words:** SPE; HPLC-ESI-MS-MS; baked and fried foods; acrylamide

中图分类号: TS237

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 14-0192-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201514037

丙烯酰胺结构简单的小分子化合物, 白色、透明片状晶体, 可溶于水、乙醇、乙酸乙酯等, 在室温条件下很稳定, 但当处于熔点或以上温度、在氧化条件下以及在紫外线的作下, 很容易发生聚合反应, 在工业上主要用丙烯腈作为原料合成<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 食品中的丙烯酰胺主要在高碳水化合物、低蛋白质的植物性食物加热烹调过程中形成的, 140~180 °C为其生成的最佳温度。食物在水中烹调时最高温度不会超过100 °C, 但是, 当烘烤或者油炸食品时, 水分损失较多, 表面温度升高, 丙烯酰胺就会大量形成<sup>[4-8]</sup>。

1994年国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)对丙烯酰胺的致癌性进行了评估, 将其列为2A类致癌物<sup>[9-11]</sup>。自2002年瑞典科学家首次在烘烤、油炸等食品中检出丙烯酰胺后, 其在食品中的污染问题引起了国际社会和各国政府的高度关注<sup>[12-15]</sup>。我国居民的饮食文化较为多元化, 焙烤、油炸类食品因其种类繁多、味道各异而广受喜爱, 人群食用频率较高, 摄入量较大<sup>[16-20]</sup>, 但是, 目前国内对于丙烯酰胺的监控存在一定的空白。

目前国内外对丙烯酰胺的检测主要有气相色谱法<sup>[21]</sup>、

收稿日期: 2015-01-14

基金项目: 中山市科技计划项目(2013A 3FC0322); 广东省省级科技计划项目(2014A040401011);

国家质检总局科技计划项目(2015IK260)

作者简介: 李双宜(1984—), 男, 助理工程师, 本科, 研究方向为食品添加剂和兽药残留检测技术。E-mail: lishuangyi@zs.gdciq.gov.cn

\*通信作者: 李蓉(1969—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测技术。E-mail: lir@zs.gdciq.gov.cn

高效液相色谱法<sup>[21-22]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[23-24]</sup>和高效液相色谱-串联质谱法<sup>[24-27]</sup>。气相色谱法和气相色谱-质谱联用法前处理步骤复杂,需要衍生化;液相色谱法不是确证方法。张琦等<sup>[25]</sup>使用液相色谱-质谱对市售的面包、方便面和薯片3大类样品中丙烯酰胺含量进行了测定;刘红河等<sup>[26]</sup>检测了谷类煎炸食品、薯片、膨化食品、月饼、豆制品中丙烯酰胺含量。本实验在总结以上方法的基础上,采用Cleanert SLE固相萃取(solid phase extraction, SPE)柱净化,高效液相色谱-电喷雾离子化串联质谱(high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, HPLC-ESI-MS-MS)仪进行测定,内标法定量,针对焙烤和油炸食品建立了一种简便、快捷、准确、稳定的检测方法,适于大批量样品的实时监测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甲醇、正己烷、乙酸乙酯(均为色谱纯) 德国Meker公司;硫酸铵(分析纯) 广州化学试剂厂;丙烯酰胺标准品(纯度99.0%)、<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-丙烯酰胺标准品 德国Dr.Ehrenstorfer公司;Cleanert SLE固相萃取柱(14.5 g/60 mL) 博纳艾杰尔公司;0.45 μm水系针筒式微孔滤膜过滤器 上海安谱公司。

### 1.2 仪器与设备

TSQ Quantum Access高效液相色谱-串联质谱联用仪(ESI源)、Sorvall ST40通用型台式离心机 美国Thermo Fisher Scientific公司;GM200刀式捣磨仪 德国Retsch公司;MMV-1000W分液振荡仪 日本Eyela公司;Laborota 4003旋转蒸发仪 美国Heidolph公司;TruboVapII全自动浓缩仪 美国Caliper公司;Milli-Q超纯水系统 美国Millipore公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 前处理样品提取与净化

样品经刀式捣磨仪研磨粉碎,准确称取1.00 g样品置于50 mL离心管中,加入10 μg/mL的<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-丙烯酰胺内标工作溶液10 μL、超纯水10 mL,振摇30 min后,于4 500 r/min离心5 min,转移上清液,并加入硫酸铵15 g,振荡10 min,使其充分溶解,提取液于4 500 r/min离心5 min,取上清液备用。

上清液全部经Cleanert SLE固相萃取柱吸附,用70 mL正己烷淋洗,控制流速为10 mL/min,弃去正己烷淋洗液。用70 mL乙酸乙酯洗脱,控制流速为10 mL/min,收集洗脱溶液,并在45 °C水浴中减压旋转蒸发至近干,用5 mL乙酸乙酯洗涤蒸发瓶3次,转移洗涤液至15 mL试管,并加入1.0 mL 0.1%体积分数的甲酸

溶液,在45 °C氮吹浓缩至1.0 mL以下,用0.1%体积分数的甲酸溶液定容至1.0 mL,涡旋振荡,过0.45 μm水相滤膜,待LC-MS-MS测定。

#### 1.3.2 标准曲线的制备

分别称取适量的丙烯酰胺和<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-丙烯酰胺标准品,用甲醇溶解定容于100 mL容量瓶,使丙烯酰胺标准储备液质量浓度为100 μg/mL,<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-丙烯酰胺标准储备液质量浓度为10 μg/mL。将100 μg/mL的丙烯酰胺标准溶液配制为适当质量浓度10、50、100、500、1 000、3 000 ng/mL的标准工作液,标准工作液含内标质量浓度为100 ng/mL。

#### 1.3.3 LC-MS-MS分析条件

色谱柱:Atlantis<sup>TM</sup> dC<sub>18</sub>(150 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相:水(含0.1%体积分数的甲酸):甲醇(9:1),流速0.2 mL/min;柱温30 °C;进样量10 μL。

电离方式:ESI(+);喷雾电压:4 000 V;鞘气压力:40 psi;辅助气压力:5 psi;金属毛细管温度:350 °C;扫描方式:选择反应检测扫描(selected reaction monitoring, SRM)。

分别选取离子对质荷比(*m/z*)为72.20>55.40和75.20>58.40做为丙烯酰胺及其内标的定量离子,*m/z* 72.20>44.50做定性离子,以保留时间和各对离子的响应强度比例作为定性标准,内标法定量,计算样品中丙烯酰胺的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理方法的优化

#### 2.1.1 提取溶剂的选择

丙烯酰胺在水中的溶解度很大,可以直接用水作为其提取液。在沉淀蛋白质时,由于Carrez会带入干扰离子,因此选择使用高浓度的硫酸铵溶液做为沉淀试剂。由于焙烤和油炸食品中淀粉含量较高,超声或加热会使样品糊化,所以使用振荡的形式提取。

#### 2.1.2 固相萃取柱的确定

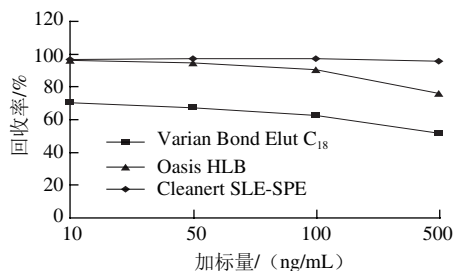


图1 不同的固相萃取柱的萃取效果比较

Fig.1 Comparison of different solid phase extraction columns

在检测方法方面,GC-MS法和LC-MS-MS法两者都可以进行定性定量分析,灵敏度也比较高,但相对来说

LC-MS-MS法因不需溴化而显得较简便。不同的LC-MS-MS法主要的区别还是在于前处理中的萃取步骤,大部分方法使用的萃取柱填料主要是HLB、C<sub>18</sub>和硅藻土,但是通回收验证,HLB、C<sub>18</sub>固相萃取柱并不适合丙烯酰胺的净化,而部分硅藻土固相萃取柱,例如Chem Elut柱,对薯片类高含量样品的吸附效果不佳,不能很好的满足回收要求。实验最后选择了大体积的Cleanert SLE固相萃取柱做为替代品,并对比了Oasis HLB、Varian Bond Elut C<sub>18</sub>、Cleanert SLE 3种不同萃取柱的萃取效果,结果见图1。

由图1可见,Varian Bond Elut C<sub>18</sub>柱极性偏弱,对丙烯酰胺保留性较差,因此不适用;Oasis HLB柱对极性化合物具有优异的保留能力,但随着丙烯酰胺的含量升高,其回收能力及稳定性下降;Cleanert SLE-SPE柱使用具有极大表面积和极小的表面活性的硅藻土,能够提供一理想且稳定的液液分配支撑表面,以便使丙烯酰胺被乙酸乙酯从吸附剂中完全萃取出来。

## 2.2 液相色谱条件优化

丙烯酰胺具有较强的极性,使用水做为流动相时,在普通的反相色谱柱中的保留时间较短,Atlantis™ dC<sub>18</sub>色谱柱对极性化合物表现出优异的保留性,且不对疏水性化合物表现出过强的保留性,因此,选择150 mm的Atlantis™ dC<sub>18</sub>做为色谱柱,并且通过调节流动相比比例和流速控制丙烯酰胺的出峰时间(图2)。最终用水-甲醇(9:1, V/V)做为流动相,并在水相中加入0.1%体积分数的甲酸,提高其电离能力。

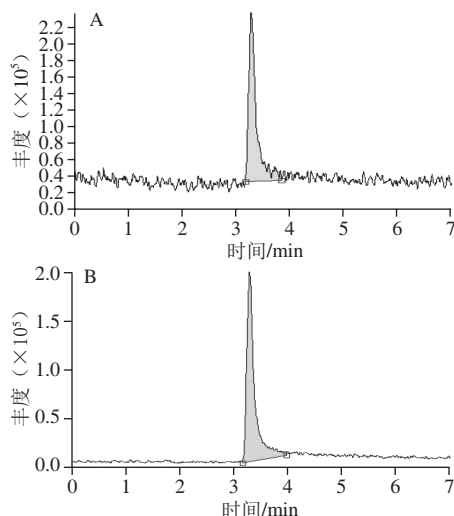


图2 丙烯酰胺标准品(A)和<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-丙烯酰胺标准品(B)色谱图  
Fig.2 Chromatograms of acrylamide standard and <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-acrylamide standard

## 2.3 质谱条件优化

通过解析丙烯酰胺的解离方式可以发现,母离子在一定的碰撞能量下可能发生脱氨、脱水、脱乙烯后得到子离子 $m/z$  55、 $m/z$  54、 $m/z$  44。预实验中,子离子 $m/z$  55在碰撞能量为10 eV时子离子 $m/z$  55获得较高的丰度比,

而获得子离子 $m/z$  54和 $m/z$  44则需要15 eV和17 eV的碰撞能量,且效果不如 $m/z$  55,故此选择子离子 $m/z$  55作为定量离子,子离子 $m/z$  44做为定性离子。

## 2.4 校准曲线和定量限

参考实际测试样品获得的丙烯酰胺含量数值,按1.3.2节配制10~3 000 ng/mL系列质量浓度的校准曲线,按1.3.3节HPLC-MS-MS条件进样,得到丙烯酰胺标准曲线相关系数均大于0.998,表明丙烯酰胺在该范围内的线性关系良好。根据信噪比强度确定丙烯酰胺的检出限( $R_{SN}=3$ )为1.0 μg/kg,定量限( $R_{SN}>10$ )为10.0 μg/kg。

## 2.5 方法的回收率与精密度

按照1.3.1节以空白面粉为基质,在0.01、0.1和1.0 mg/kg三个添加水平进行回收率实验,每个水平平行检测6次,测定后计算加标回收率及相对标准偏差,结果见表1。在3个添加量(10、100、1 000 μg/kg)的平均回收率为96.8%,相对标准偏差为2.7%。

表1 丙烯酰胺在面粉中的添加回收率  
Table 1 Recoveries of acrylamide spiked in flour

添加量/ (μg/kg)	实测值/ (μg/kg)	回收率/%	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%
10	9.45	94.5	93.78	1.5
	9.21	92.1		
	9.27	92.7		
	9.38	93.8		
	9.61	96.1		
	9.35	93.5		
100	97.34	97.3	97.55	1.7
	98.59	98.6		
	100.14	100.1		
	97.57	97.57		
	95.59	95.59		
	96.14	96.14		
1 000	997.54	99.8	99.15	1.6
	1 011.87	101.9		
	986.41	98.6		
	990.78	99.1		
	978.67	97.9		
	976.42	97.6		

## 2.6 方法的干扰实验

丙烯酰胺作为合成水质净化絮凝剂聚丙烯酰胺的原料单体,聚丙烯酰胺在生产使用过程中均有微量的游离丙烯酰胺单体释放,因此有必要验证实验用水的干扰性。以实验用水代替样品,加入适量的内标溶液,按1.3.1节进行处理后进样分析,在HPLC-MS-MS色谱图中丙烯酰胺的出峰位置上并未发现杂峰,证明实验用水中并对实验结果造成影响。

## 2.7 实际样品分析

根据季节特性与超市的销售情况,从超市中购得数批焙烤和油炸食品,按照1.3节建立的分析方法进行检测,结果见表2。

在实际测试的102个样品中有8个焙烤类食品测试结果为未检出,油炸类食品中丙烯酰胺的含量远高于焙烤类。此外,即使是同类食品,丙烯酰胺生成与其加工工艺如加工的温度高低、时间长短等有密切关系。长期食用含有大量丙烯酰胺的食品将对人体造成潜在危害,因此,建议有关部门加强对丙烯酰胺进行监控,促使生产企业改善生产工艺,减少加工产品时丙烯酰胺的生成。

表2 常见食品中丙烯酰胺含量的测定结果  
Table 2 Contents of acrylamide in common foods

样品种类	焙烤					油炸		
	饼干	月饼	面包	薯片	方便面	饼干	薯片	方便面
测试数量	22	20	22	3	6	4	15	10
含量范围/( $\mu\text{g/kg}$ )	ND~351.74	ND~43.98	ND~168.09	36.16~1 672.55	120.19~614.76	375.12~609.24	687.21~2 839.53	219.78~769.18
平均含量/( $\mu\text{g/kg}$ )	143.52	19.84	61.48	597.45	278.97	448.47	978.45	394.42

注:ND.未检出。

### 3 结 论

本实验建立了焙烤及油炸食品中丙烯酰胺快速、准确、稳定的SPE-HPLC-ESI-MS-MS检测方法。采用水作为提取液,方便简单环保,Cleanert SLE固相萃取柱净化,回收率高,并且有效去除了杂质的干扰,已实际应用于焙烤及油炸食品中丙烯酰胺含量的测定。

### 参考文献:

- [1] 丁伟. 丙烯酰胺类聚合物合成及性能研究[D]. 大庆: 大庆石油学院, 2006.
- [2] 黄绣川. 丙烯腈催化水合合成丙烯酰胺的研究[D]. 成都: 四川大学, 2004.
- [3] 白天江. 腈水合酶产生菌的培养条件及丙烯酰胺晶体的制备[D]. 哈尔滨: 哈尔滨理工大学, 2012.
- [4] WEISSHAAR R. Acrylamide in heated potato products-analytics and formation routes[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2004, 106: 786-792.
- [5] 郑宗平, 秦川, 兰山, 等. 食品体系中丙烯酰胺的研究进展: 抑制剂及其抑制机理[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 282-288. doi: 10.7506/spkx1002-6630-201401056.
- [6] 龙小涛, 何嘉锐, 叶雪丽. 食品中丙烯酰胺的抑制方法研究进展[J]. 现代食品科技, 2012(6): 687: 688-690.
- [7] 隋大鹏. 烹饪过程中丙烯酰胺产生的机理及控制方法研究进展[J]. 食品与机械, 2013(1): 247-249.
- [8] 徐东路, 宋贤良. 食品中的丙烯酰胺及生物解决方案[J]. 食品与发酵工业, 2010(12): 152-155.
- [9] 武丽荣, 蒋新正, 鲍元奇. 油炸食品中丙烯酰胺的形成及减少措施[J]. 中国油脂, 2005, 30(7): 18-21.
- [10] 王桂荣, 何国庆. 食品中丙烯酰胺的致癌性[J]. 食品工业科技, 2011(6): 467-470.
- [11] RICE J M. The carcinogenicity of acrylamide[J]. Mutation Research, 2005, 580(1): 3-20.
- [12] 郭灿烂, 李斌, 肖经纬. 丙烯酰胺神经毒性机制研究概况[J]. 卫生研究, 2010(3): 282-285.
- [13] 林仲坪. 食品中丙烯酰胺研究现状[J]. 中国科技信息, 2006(1): 87.
- [14] 郭波莉, 魏益民, 潘家荣. 食品中丙烯酰胺风险评估及其形成机理研究进展[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 247-251.
- [15] 沈要林, 曾庆孝, 朱志伟. 热加工食品中丙烯酰胺残留及安全性评价[J]. 现代食品科技, 2006(2): 195-198.
- [16] 熊敏, 钟彩颜, 汪莉, 等. 食品中丙烯酰胺污染的研究进展[J]. 现代预防医学, 2009(23): 4450-4451.
- [17] 黄伟雄, 吴西梅, 李敏, 等. 广东省油炸和焙烤食品的丙烯酰胺污染监测与影响因素分析[J]. 中国预防医学志, 2010(11): 1088-1091.
- [18] 耿志明, 蒋荣, 陈明. 面团配方及工艺条件对烧饼中丙烯酰胺形成的影响[J]. 中国食品学报, 2009, 9(4): 143-148.
- [19] 张文玲, 郭颖, 郝亚楠, 等. 中式油炸食品中丙烯酰胺测定及降低方法初探[J]. 粮食与油脂, 2011(12): 23-26.
- [20] 于胜弟, 黄卫宁, 邹奇波, 等. 中式油条中丙烯酰胺含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 143-148.
- [21] 张辉珍, 马爱国, 孙永叶, 等. 食品中丙烯酰胺测定的前处理条件和色谱条件优化[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 278-282.
- [22] 蒋丽. 高效液相色谱检测高温烹制的淀粉类食品中丙烯酰胺[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(6): 1452-1454.
- [23] 陈旭明, 杨泽川, 谢鸿. 气质联用法测定油炸型膨化食品中的丙烯酰胺[J]. 光谱实验室, 2013(5): 2561-2564.
- [24] ONO H, CHUDA Y, OHNISHI-KAMEYAMA M, et al. Analysis of acrylamide by LC-MSMS and GC-MS in processed Japanese foods[J]. Food Additives and Contaminants, 2003, 20(3): 215-220.
- [25] 张琦, 马金波. 大体积柱结合同位素稀释技术对食品中丙烯酰胺的测定方法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(3): 330-331.
- [26] 刘红河, 陈春晓, 柳其芳, 等. 高效液相色谱-串联质谱联用测定富含淀粉食品中丙烯酰胺[J]. 分析化学, 2006, 34(特刊): 235-238.
- [27] ROSÉN J, NYMAN A, HELLENAS K E. Retention studies of acrylamide for the design of a robust liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for food analysis[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1172: 19-24.