

同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法同步快速测定热加工肉类中7种杂环胺

诸力¹, 贾伟¹, 万旭志¹, 姚明哲², 章宇^{1*}

(1. 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 杭州 310058; 2. 中国农业科学院茶叶研究所, 杭州 310008)

摘要: 目的 建立同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法同步快速测定热加工肉类中7种杂环胺含量的分析方法。**方法** 样品经甲醇水溶液(3:7, V:V)均质提取, 低温高速离心后上清液采用聚苯乙烯-二乙烯苯固相萃取净化。经 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm)反相色谱柱分离, 三重四极杆串联质谱仪在可编程多反应监测正离子模式下同位素内标法定量测定。**结果** 在质量浓度 0.1~100.0 ng/mL 范围内, 各杂环胺标准品均呈现良好线性关系, 相关系数(r^2)均大于 0.999, 检出限和定量限范围分别在 0.02~0.04 ng/g 和 0.06~0.14 ng/g 之间。在低、中、高3种当量水平下加标回收率范围为 84.62%~111.97%, 日内精密度和日间精密密度范围分别为 0.83%~6.17% ($n=6$)和 1.84%~9.78% ($n=18$)。**结论** 本方法稳定、灵敏、高效, 适用于不同热加工肉类中多种杂环胺的日常痕量检测分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 同位素稀释; 固相萃取; 杂环胺; 热加工肉类

Synchronous and rapid determination of 7 kinds of heterocyclic aromatic amines in thermal processing meat by isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHU Li¹, JIA Wei¹, WAN Xu-Zhi¹, YAO Ming-Zhe², ZHANG Yu^{1*}

(1. College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310008, China)

ABSTRACT: Objective To develop an rapid method for simultaneously analyzing 7 kinds of heterocyclic aromatic amines in thermal processing meat foods based on isotope dilution ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Homogenized samples were extracted with methanol-water solution (3:7, V:V), then the supernatant was centrifuged at low-temperature and high-speed, and cleaned up with polystyrene-divinylbenzene solid phase extraction column. The samples were separated on an ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm) reversed phase column, and detected by scheduled multiple reaction monitoring using triple quadrupole tandem mass spectrometer and quantified by isotope internal standard method. **Results** All standard solution of heterocyclic aromatic amines showed good linearity between the mass concentration of 0.1~100.0 ng/mL with high significant correlations ($r^2>0.999$), and the limits of detection and limits of quantitation

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600500)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600500)

*通信作者: 章宇, 博士, 教授, 主要研究方向为食品加工来源污染物危害控制。E-mail: y_zhang@zju.edu.cn

*Corresponding author: ZHANG Yu, Ph.D, Professor, Zhejiang University, No.866, Yuhangtang Road, Hangzhou 310058, China. E-mail: y_zhang@zju.edu.cn

were 0.02–0.04 ng/g and 0.06–0.14 ng/g, respectively. In addition, the spiked (low, medium and high) recoveries were 84.62%–111.97%, and intra-day precisions and inter-day precisions were 0.83%–6.17% ($n=6$) and 1.84%–9.78% ($n=18$), respectively. **Conclusion** The method is stable, sensitive and efficient, and suitable for the daily trace analysis of various heterocyclic aromatic amines in different thermal processing meat foods.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotope dilution; solid phase extraction; heterocyclic aromatic amines; thermal processing meat

0 引言

杂环胺(heterocyclic aromatic amines, HAAs)是一类具有致癌和致突变性质的杂环芳香族化合物,主要由富含蛋白质的畜禽肉^[1-2]、鱼肉^[3-4]等经热加工过程形成,在中药材^[5]和部分环境样本中也有报道^[6]。目前已分离鉴定30多种杂环胺^[7],根据其结构特征大致可分为氨基咪啉类(amino-carbolines)和氨基咪唑氮杂芳烃类(amino-imidazo-azoarenes, AIAs)。长期研究表明杂环胺能增加动物及人类前列腺^[8]、乳腺^[9]、结肠^[10]等器官产生肿瘤和癌症风险,另外也有报道证明其致突变能力甚至是黄曲霉毒素的6~10倍^[11]。国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)已将2-氨基-3-甲基-3H-咪唑并[4,5-f]喹啉(2-amino-3-methyl-3H-imidazo [4,5-f] quinoline, IQ)归类为2A级致癌物,而其他几种杂环胺包括2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP)等则被定义为2B级致癌物^[12]。美国国家毒理学项目(National Toxicology Program)也将常见的HAAs列入国家毒理学研究计划中^[13]。

由于各类食品基质相当复杂,而且其中HAAs含量极微(ng/g)^[14],因此对食品中的杂环胺进行测定分析难度较大。GB 5009.243—2016《食品安全国家标准 高温烹调食品中杂环胺类物质的测定》和SN/T 4140—2015《出口鱼肉香肠和香精中多种杂环胺的测定》中对热加工肉制品中杂环胺测定方法进行了描述,但以上方法均存在检测杂环胺种类单一(前者同步监测5种杂环胺),灵敏度差(后者定量限为10 μg/kg),前处理步骤繁琐等缺点。目前文献报道中,杂环胺提取和纯化前处理方法有液液萃取法^[15],该法通常将目标分析物从水相提取到有机相,己烷、乙酸乙酯和二氯甲烷通常用作萃取溶剂^[16-17],但仍存在操作步骤烦琐、环境不友好及回收率低等缺点。另外前处理方法还包括微波辅助提取^[18]、超临界流体萃取法^[19]、微萃取法^[20]、固相萃取法^[21]等,其中固相萃取法因其选择性强、分离时间短、操作简便等优点运用于杂环胺检测方法前处理^[22]。目前杂环胺常用检测技术主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[21]、高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-

mass spectrometry, HPLC-MS)^[23-25]、气相色谱-质谱法(gas chromatography -mass spectrometry, GC-MS)^[26]、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[27]以及酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[28]等。因此本研究通过固相萃取前处理,建立了一种同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法同步快速测定热加工肉类中7种杂环胺的方法,为杂环胺膳食外暴露水平监测以及风险评估提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

所涉及的热加工肉类样品均来自加工自制及市场成品采购。

IQ(纯度≥98%,德国Dr. Ehrenstorfer GmbH公司); PhIP(纯度≥98%)、2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑[4,5-b]吡啶-D₃(2-amino-1-methyl-6-phenylimidazole [4,5-b] pyridine-D₃, PhIP-D₃, 纯度≥98%)、2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉(2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline, MeIQx, 纯度≥99%)、2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉-D₃(2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline-D₃, MeIQx-D₃, 纯度≥97%)、2-氨基-3,7,8-三甲基-3H-咪唑并[4,5-f]喹啉(2-amino-3,7,8-trimethyl-3H-imidazole and [4,5-f] quinoxaline, 7,8-DiMeIQx, 纯度≥99%)、2-氨基-3,4,8-三甲基-3H-咪唑并[4,5-f]喹啉(2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo [4,5-f] quinoxaline, 4,8-DiMeIQx, 纯度≥98%)、2-氨基-3,4-二甲基-3H-咪唑并喹啉(2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazoquinoline, MeIQ, 纯度≥98%)、2-氨基-3-甲基-3H-咪唑并[4,5-f]喹啉(2-amino-3-methyl-3H-imidazo [4,5-f] quinoxaline, IQx, 纯度≥98%)(加拿大TRC公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司); 甲酸铵(纯度≥99.9%)、甲酸(纯度≥95%)(德国Sigma公司); 超纯水由Milli-Q水纯化系统制备(法国Millipore公司); CNW Poly-Sery PSD聚苯乙烯-二乙烯苯固相萃取(solid phase extraction, SPE)小柱(3cc, 200 mg)(上海安谱实验科技股份有限公司); 液相色谱柱 Kinetex C₁₈100A (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国Phenomenex公司); 液相色谱柱 Shim-pack GIS C₁₈ (75 mm×2.1 mm, 2 μm)(日本岛津公司); 液相色谱柱 ACQUITY UPLC®BEH

C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC®HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、CORTECSTM UPLC®BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)(美国 Waters 公司)。

1.2 仪器与设备

AB Sciex TQ 5500 型串联三重四极杆质谱仪(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司); LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); T10 高速均质仪(德国 IKA 公司); 1-16K 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); Vortex 1 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); 固相萃取仪(FG-24)(美国 Waters 公司); ME204 分析天平[精度 0.1 mg, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 样品提取前处理

称取 2 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 μL 氘代杂环胺混标溶液(PhIP-D₃ 和 MeIQx-D₃), 再加入甲醇水溶液(3:7, V/V, 下同)10 mL 均质 2 min, 10000 r/min 离心 2 min, 待净化。

1.3.2 固相萃取净化

固相萃取柱预先依次用 2 mL 甲醇和 2 mL 甲醇水溶液(3:7)活化。量取 5 mL 上清液加入固相萃取柱中, 弃去流出液, 依次用纯水和甲醇水溶液(3:7)淋洗, 每次淋洗后都需要将淋洗液抽干, 最后用 5 mL 乙腈洗脱, 流速小于 1 mL/min。洗脱液于 40 °C 水浴下氮吹至近干, 加入 0.1 mL 初始流动相溶液, 涡旋均匀, 过 0.22 μm 有机滤膜, 待上机分析。

1.3.3 标准工作液配制

分别称取 7 种杂环胺标准样品和 2 种氘代同位素标准品各 0.05 g, 用甲醇水溶液(3:7)溶解并转移至 50 mL 容量瓶定容, 分别配制成 1 mg/mL 标准溶液, 4°C 下冷藏保存待用。

同位素内标溶液配制: 配制 100 ng/mL 同位素混合标准溶液用于测试样品加标; 另外用甲醇水溶液(3:7)配制 20 ng/mL 同位素混标用于标准曲线梯度稀释。

标准曲线溶液的配制: 采用含 20 ng/mL 同位素混标稀释液, 分别配制 7 个不同质量浓度 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL 7 种杂环胺混合标准溶液, 现配现用。

1.4 液相色谱-串联质谱条件

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm); 流动相 A: 含体积分数 0.1% 甲酸和 1 mmol/L 甲酸铵的水溶液, 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 5% B; 1.0~6.0 min, 5%~98% B; 6.0~7.5 min, 98% B; 7.5~7.6 min, 98%~5% B; 7.6~10.0 min, 5% B; 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 1.0 μL; 柱温: 35°C; 运行时间: 10 min。

1.4.2 质谱条件

质谱监测模式: 可编程多反应监测 (scheduled multiple reaction monitoring, SMRM); 离子源: 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI) 正离子模式, 温度 500°C, 电压 5500 V; 雾化气(GS1)压力: 334.7 kPa; 辅助气(GS2)压力: 334.7 kPa; 气帘气 (curtain gas) 压力: 241.3 kPa。定性、定量离子对、去簇电压、碰撞能量、保留时间等参数见表 1。

表 1 杂环胺及其同位素内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters for HAAs and their isotope internal standards

化合物	保留时间/min	离子对	去簇电压/V	碰撞能量/eV
PhIP	5.0	225/210*	200	40
		225/140	200	65
PhIP-D ₃	5.0	228/210*	200	40
		228/140	200	65
MeIQx	4.4	214/199*	180	35
		214/131	180	50
MeIQx-D ₃	4.4	217/199*	180	35
		217/131	180	50
MeIQ	4.1	213/198*	160	35
		213/145	160	39
7,8-DiMeIQx	4.6	228/131*	180	51
		228/213	180	37
IQ	4.0	199/184*	170	36
		119/157	170	46
IQx	4.2	200/185*	170	36
		200/158	170	46
4,8-DiMeIQx	4.6	228/160*	170	40
		228/145	170	32

注: *为定量特征离子对。

1.5 数据处理

仪器分析数据采集采用 Analyst™ 1.6.2 软件, 数据定量分析采 MultiQuant™ 3.0.2 软件, 图形绘制使用 Graphpad Prism 8.0.1 软件。定量分析采用同位素内标校准法, 其中 PhIP 采用 PhIP-D₃ 进行校准, 其他杂环胺则都采用 MeIQx-D₃ 进行校准。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

分别配制 0.5 μg/mL 的 9 种 HAAs 标准品溶液进行质谱条件优化。采用 ESI+扫描模式, 以准分子离子[M+H]⁺为母离子, 进行二级质谱优化, 参数包括碰撞能量、去簇电压、电离温度等, 优化结果详见表 1。本研究采用了可编程多反应监测, 该模式可以在不同时间段同时对多化合物进行监测, 较传统 MRM 相比极大得提高了单位检测通量, 可在单位时间内有效增加信号扫描点数并改善峰型, 提高整体精密度和重现性^[29]。

2.2 色谱条件优化

本方法分别采用 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm,

1.7 μm)、ACQUITY UPLC®HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、CORTECSTM UPLC®BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)、Kinetex C₁₈ 100A (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Shim-pack GIS C₁₈ (75 mm×2.1 mm, 2 μm) 色谱柱进行色谱条件优化。结果如图 1 所示, 发现如 IQ、MeIQ 等化合物在部分色谱柱子上并未形成有效色谱峰, 还有部分化合物存在一定程度的色谱峰拖尾现象, 而 9 种化合物在 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm) 色谱柱上保留色谱峰型及分离度最佳。一个原因可能是 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ 填料对各化合物具有良好选择性; 另一方面该色谱柱更长且柱径更宽, 较其他色谱柱体积更大可承载更高的流速而使柱效更佳, 因此选择 ACQUITY UPLC®BEH C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.7 μm) 为本研究色谱柱。流动相优化包括甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(0.1%甲酸和 1 mmol/L 甲酸铵)、乙腈-水(0.1%甲酸和 1 mmol/L 甲酸铵)等体系。结果表明, 采用乙腈-水(0.1%甲酸和 1 mmol/L 甲酸铵)作为流动相可有效提高[M+H]⁺化合物离子化效率, 并且加入甲酸铵之后的缓冲体系可进一步增加系统稳定性, 从而使 9 种化合物分离度和灵敏度达到最佳, 故流动相采用乙腈-水(0.1%甲酸和 1 mmol/L 甲酸铵)。

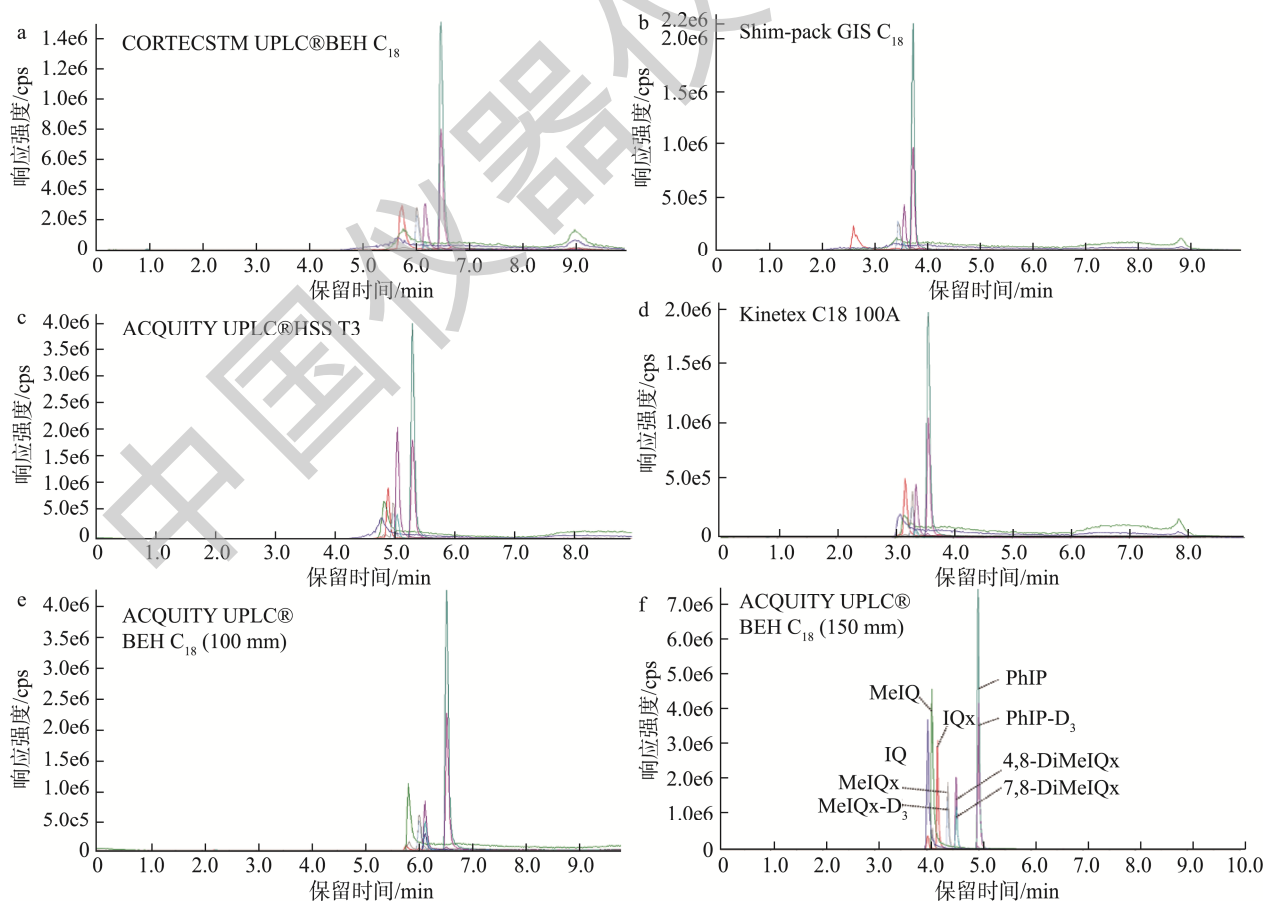


图 1 不同色谱柱条件下 9 种杂环胺的总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagrams of 9 kinds of HAAs with different chromatographic columns

2.3 前处理条件优化

本研究首次提出采用 CNW Poly-Sery PSD 聚苯乙烯-二乙烯苯固相萃取(solid phase extraction, SPE)小柱(3 cc, 200 mg)进行 HAAs 的固相萃取预处理。聚苯乙烯-二乙烯苯填料表面同时具有亲水性和疏水性基团, 从而对各类极性和非极性化合物具有较均衡的吸附作用, 值得一提的是其吸附能力和样品容量远高于 C₁₈ 键合硅胶^[30]。本研究中分别对淋洗和洗脱溶剂及体积等固相萃取参数进行了优化, 其中淋洗液优化分别选用纯水、甲醇水溶液(3:7、5:5、7:3)、纯甲醇等。测定结果发现纯水和甲醇水溶液(3:7)均未检出 HAAs, 但随着淋洗液中甲醇比例提高, 从甲醇水溶液(5:5)淋洗液中开始出现不同浓度和种类的 HAAs, 而且随着甲醇比例升高 HAAs 含量也越高。因此又结合杂环胺化学性质确定甲醇水溶液(3:7)为最佳提取试剂。另外根据 SPE 柱特性, 洗脱液优化选择了乙腈、正己烷、二氯甲烷等弱极性溶剂, 结果相比之下乙腈的洗脱效果最佳。因此又对乙腈洗脱体积做进一步优化, 将 HAAs 混合标准品上 SPE 柱后采用乙腈洗脱, 每次 1 mL 溶剂洗脱, 5 mL 洗脱后回收率测定结果如图 2 所示。结果发现乙腈作为洗脱剂对各 HAAs 有较好的洗脱效果, 另外当洗脱体积大于 5 mL 后洗脱液只能检测到微量 HAAs。因此从实验结果综合考虑, 最终选择纯水和甲醇水溶液(3:7)为淋洗溶剂, 乙腈为洗脱溶剂以及最佳洗脱体积为 5 mL。

2.4 基质效应评价

基质效应(matrix effect, ME)是评价质谱定量分析准确性的重要因素, 因此本研究根据相应质量浓度空白溶剂标准样品进行基质效应评价^[18], 计算公式(1)如下:

$$ME/\% = \frac{k_{\text{基质}} - k_{\text{溶剂}}}{k_{\text{溶剂}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中, $k_{\text{基质}}$ 为基质标准曲线斜率, $k_{\text{溶剂}}$ 为溶剂标准曲线斜率, 当 ME 为正值时表示基质增强效应, 反之负值代表基质抑制效应。结果表明不同杂环胺基质效应不明显($\pm 20\%$ 之内),

加之本研究采用同位素内标法校准, 因此无需采用相应基质匹配标样进行校准。

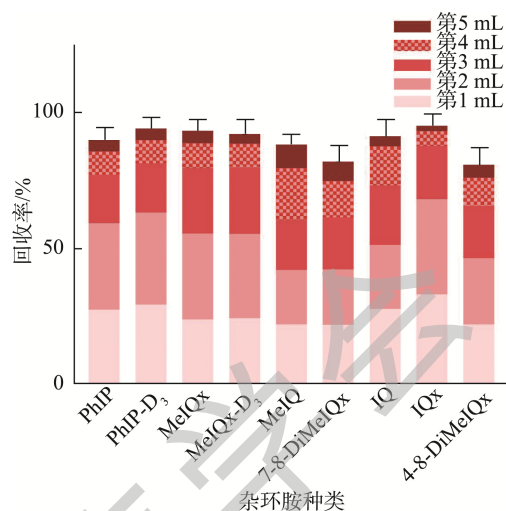


图 2 不同体积乙腈洗脱溶剂不同杂环胺的回收率($n=3$)

Fig.2 Recoveries of different HAAs in acetonitrile eluting solvents of different volumes ($n=3$)

2.5 定量分析方法学验证

2.5.1 标准曲线及线性范围

分别配制 7 个不同质量浓度的 HAAs 混合标准品, 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 ng/mL。以标准品质量浓度与同位素内标浓度的比值作为 X 轴, 以标准品峰面积与同位素内标峰面积的比值作为 Y 轴, 得到相应的线性回归方程, 其中 PhIP 内标为同位素 PhIP-D₃, 而其他化合物均由 MeIQx-D₃ 进行校准。线性回归方程和相关系数 r^2 如表 2 所示。配制低浓度的混合标准溶液, 稀释后分别以 3 倍信噪比(S/N)和 10 倍信噪比(S/N)基质加标浓度作为检出限和定量限, 计算可得 7 种 HAAs 检出限范围在 0.02~0.04 ng/g 之间, 定量限范围在 0.06~0.14 ng/g。在质量浓度 0.1~100.0 ng/mL 范围内, 各杂环胺标准品均呈现良好线性关系。

表 2 HAAs 标准曲线的线性回归方程和参数

Table 2 Linear regression equations and parameters of HAAs standard curves

名称	线性范围/(ng/mL)	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/(ng/g)	定量限/(ng/g)
PhIP		$Y=136698X-29647$	0.9993	0.03	0.10
MeIQx		$Y=45632X+13038$	0.9999	0.03	0.10
MeIQ		$Y=106535X-59054$	0.9998	0.02	0.06
7-8-DiMeIQx	0.1~100.0	$Y=48872X+2112.6$	0.9998	0.03	0.10
IQ		$Y=82219X-32861$	0.9998	0.03	0.10
IQx		$Y=64615X+20556$	0.9997	0.04	0.14
4-8-DiMeIQx		$Y=19686X+1205.4$	0.9995	0.03	0.10

2.5.2 精密度及加标回收率

采用自制煎牛排作为空白基质进行加标回收实验,按照1.3所述方法进行加标回收实验,添加7种杂环胺混合标样浓度分别为5、10和50 ng/g的低、中、高3种当量水平。每种加标水平设置6个平行($n=6$),计算日内精密度;通过3 d的重复实验,计算日间精密度($n=18$)。如表3所示,热加工肉类食品中7种杂环胺的日内精密度范围为0.83%~6.17%,日间精密度范围1.84%~9.78%,加标回收率范围为84.62%~111.97%,方法均具有良好的重现性与回收率。

2.5.3 实际样品检测

分别对市场采购和自制的热加工肉类食品31份样本进行杂环胺定量检测分析,其热加工方式包含烤、煎、炸

等,肉类种类涵盖日常饮食中的鸡肉、牛肉、羊肉、猪肉、海产品等及其加工制品。测定结果如表4所示,发现有检出的杂环胺种类包括PhIP、MeIQx、4,8-DiMeIQx,检出率分别为70.0%、61.3%和9.7%,其余杂环胺在所测样品中均未检出。其中PhIP和MeIQx含量最高样品“煎牛排1”为自制所得,此样品采用瘦牛排在不加食用油条件下300 °C热铁锅双面煎制各6 min,直至肉质焦黄,两种杂环胺含量分别达到(48.34±5.92)和(9.22±1.21) ng/g,该测定数值结果与WALTERS等^[31]研究报道中接近。虽然目前日常膳食中杂环胺暴露水平较低,据报道显示新加坡中式饮食人群平均日暴露量估计为49.95 ng/d^[32],但由于杂环胺的强致突变和致癌性,长期摄入仍然会造成一定健康风险。

表3 不同加标浓度水平下7种杂环胺的精密度及回收率
Table 3 Precision and recoveries of 7 kinds of HAAs with different spiking levels

化合物	加标水平/(ng/g)	日内精密度/%($n=6$)	日间精密度/%($n=18$)	回收率/%($n=18$)
PhIP	5	2.56	4.39	98.03±4.48
	10	1.81	2.82	98.43±2.87
	50	0.83	1.84	100.55±1.83
MeIQx	5	5.04	7.99	101.98±7.83
	10	4.86	5.04	101.62±4.96
	50	2.33	6.94	95.62±7.26
MeIQ	5	6.17	6.96	88.30±7.88
	10	3.32	6.11	89.79±6.80
	50	4.13	5.17	93.73±5.51
7,8-DiMeIQx	5	2.87	7.72	89.20±8.66
	10	3.26	5.59	91.35±6.12
	50	3.48	7.32	97.90±7.47
IQ	5	3.12	3.71	110.41±3.36
	10	3.18	4.87	104.47±4.67
	50	5.24	5.96	111.97±5.32
IQx	5	2.12	2.82	92.45±3.05
	10	5.01	6.42	97.15±6.61
	50	5.02	5.06	93.13±5.43
4,8-DiMeIQx	5	5.64	9.78	88.01±11.12
	10	4.41	6.19	84.62±7.32
	50	2.74	7.65	93.38±8.19

表4 各类热加工肉类食品中不同杂环胺含量($n=3$, ng/g)
Table 4 Content of different HAAs in different thermal processing meat foods ($n=3$, ng/g)

编号	样品类型	PhIP	MeIQx	MeIQ	7,8-DiMeIQx	IQ	IQx	4,8-DiMeIQx
S1	烤鱿鱼	0.31±0.05	0.38±0.04	/	/	/	/	/
S2	烤鸡柳	1.05±0.12	0.33±0.03	/	/	/	/	/
S3	烤羊肉	/	0.20±0.04	/	/	/	/	/
S4	烤骨肉相连	1.12±0.09	0.51±0.08	/	/	/	/	/
S5	烤鱼	0.19±0.02	0.11±0.02	/	/	/	/	/
S6	烤肠	/	/	/	/	/	/	/
S7	烤鸡肉串	0.21±0.03	0.12±0.01	/	/	/	/	/
S8	烤鸡翅尖	/	/	/	/	/	/	/
S9	炸鸭肉串	0.20±0.03	/	/	/	/	/	/
S10	煎鸡肉串	0.18±0.02	/	/	/	/	/	/

表4(续)

编号	样品类型	PhIP	MeIQx	MeIQ	7,8-DiMeIQx	IQ	IQx	4,8-DiMeIQx
S11	煎牛肉串	0.24±0.05	0.18±0.03	/	/	/	/	/
S12	烤鸡肉小串	0.22±0.02	0.21±0.01	/	/	/	/	/
S13	烤牛肉小串	0.17±0.01	0.11±0.01	/	/	/	/	/
S14	炸牛排	1.31±0.16	0.42±0.06	/	/	/	/	/
S15	炭烤羊肉串	0.31±0.03	0.16±0.02	/	/	/	/	0.29±0.02
S16	煎牛排 1	48.34±5.92	9.22±1.21	/	/	/	/	/
S17	煎牛排 2	/	/	/	/	/	/	/
S18	烤猪排	/	0.17±0.02	/	/	/	/	/
S19	煎培根	1.53±0.09	0.82±0.08	/	/	/	/	0.45±0.03
S20	煎海鱼	2.31±0.11	/	/	/	/	/	/
S21	烤猪五花肉	/	/	/	/	/	/	/
S22	炸香肠	0.11±0.01	/	/	/	/	/	/
S23	煎猪肋排	/	/	/	/	/	/	/
S24	炸鸡胸肉	2.36±0.16	0.22±0.02	/	/	/	/	/
S25	炸鸡排	10.17±1.22	1.31±0.12	/	/	/	/	0.33±0.04
S26	煎热狗	/	/	/	/	/	/	/
S27	烤热狗	/	/	/	/	/	/	/
S28	煎带鱼	0.74±0.06	/	/	/	/	/	/
S29	烤带鱼	1.13±0.09	0.19±0.02	/	/	/	/	/
S30	煎牛排 3	18.21±2.14	2.28±0.34	/	/	/	/	/
S31	煎牛排 4	27.13±2.95	3.25±0.42	/	/	/	/	/

注: /表示未检出, 即含量低于方法定量限以下。

3 结论

本研究建立了同位素稀释固相萃取超高效液相色谱-串联质谱法, 实现了热加工肉类食品中 7 种杂环胺的同步快速测定。本研究与现有国家标准方法相比具有简便快捷、稳定灵敏、环境友好等优势, 适用于大批次热加工肉类食品中多种杂环胺的同步痕量筛查分析, 同时为杂环胺膳食外暴露监测和风险评估提供有效技术支持。

参考文献

- [1] ZHANG L, CHEN Q, LIU Q, *et al.* Effect of different types of smoking materials on the flavor, heterocyclic aromatic amines, and sensory property of smoked chicken drumsticks [J]. *Food Chem*, 2022, 367: 130680.
- [2] 程轶群, 雷阳, 周兴虎, 等. 传统肉制品中杂环胺研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(5): 316-327.
CHENG YQ, LEI Y, ZHOU XH, *et al.* Heterocyclic amines in Chinese traditional meat products: A review [J]. *Food Sci*, 2022, 43(5): 316-327.
- [3] MACIT A, KIZIL M. Effect of olive leaf extract marination on heterocyclic aromatic amine formation in pan-fried salmon [J]. *J Sci Food Agric*, 2022, 102(9): 3908-3915.
- [4] 李青, 王亚南, 秦之皓, 等. 高效液相色谱-质谱串联法检测中餐常见肉类中杂环胺含量[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(8): 354-364.
LI Q, WANG YN, QIN ZH, *et al.* Analysis of heterocyclic aromatic amines in common meat types for Chinese cuisines by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2020, 36(8): 354-364.
- [5] 陆雨顺, 赵洋, 王泽帅, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱质谱法测定中药中 7 种杂环胺类物质[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(4): 1427-1434.
LU YS, ZHAO Y, WANG ZS, *et al.* Determination of seven heterocyclic aromatic amines in Chinese medicine by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap linear ion trap mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(4): 1427-1434.
- [6] 张宜升, 李文秀, 曹美娜, 等. 民用固体燃料及烹调油烟杂环胺排放及健康风险评估[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(7): 2196-2204.
ZHANG YS, LI WX, CAO MN, *et al.* Emission characteristics and health risks assessment of heterocyclic amines from residential solid fuel use and cooking oils fumes [J]. *China Environ Sci*, 2016, 36(7): 2196-2204.
- [7] GIBIS M. Heterocyclic aromatic amines in cooked meat products: Causes, formation, occurrence, and risk assessment [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2016, 15(2): 269-302.
- [8] VAN-HEMELRIJCK M, ROHRMANN S, STEINBRECHER A, *et al.* Heterocyclic aromatic amine [HCA] intake and prostate cancer risk: Effect modification by genetic variants [J]. *Nutr Cancer*, 2012, 64(5): 704-713.
- [9] ROHRMANN S, LUKAS JSU, LINSEISEN J, *et al.* Dietary intake of meat and meat-derived heterocyclic aromatic amines and their correlation with DNA adducts in female breast tissue [J]. *Mutagenesis*, 2009, 24(2): 127-132.
- [10] LE-MARCHAND L. The role of heterocyclic aromatic amines in colorectal cancer: The evidence from epidemiologic studies [J]. *Genes Environ*, 2021, 43(1): 20.

- [11] SUGIMURA T. Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan [J]. *Science*, 1986, 233(4761): 312–318.
- [12] IARC. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [R]. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1993.
- [13] NTP. Report on Carcinogenesis, 11th ed [R]. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services: Research Triangle Park, 2004.
- [14] POUZOU JG, COSTARD S, ZAGMUTT FJ. Probabilistic assessment of dietary exposure to heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons from consumption of meats and breads in the United States [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 114: 361–374.
- [15] REZAEI M, YAMINI Y, KHANCHI A, *et al.* A simple and rapid new dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry for preconcentration and determination of aluminium in water samples [J]. *J Hazard Mater*, 2010, 178(1–3): 766–770.
- [16] SANZ-ALAEJOS M, AYALA JH, GONZALEZ V, *et al.* Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 862(1–2): 15–42.
- [17] CANALES R, GUINEZ M, BAZAN C, *et al.* Determining heterocyclic aromatic amines in aqueous samples: A novel dispersive liquid-liquid micro-extraction method based on solidification of floating organic drop and ultrasound assisted back extraction followed by UPLC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2017, 174: 548–555.
- [18] AEENEHVAND S, TOUDEHROUSTA Z, KAMANKESH M, *et al.* Evaluation and application of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of polar heterocyclic aromatic amines in hamburger patties [J]. *Food Chem*, 2016, 190: 429–435.
- [19] SANZ-ALAEJOS M, AYALA JH, GONZALEZ V, *et al.* Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 862(1–2): 15–42.
- [20] OMIDI N, BARZEGAR F, ABEDI AS, *et al.* Response surface methodology of quantitative of heterocyclic aromatic amines in fried fish using efficient microextraction method coupled with high-performance liquid chromatography: Central composite design [J]. *J Chromatogr Sci*, 2021, 59(5): 473–481.
- [21] WU X, LIU X, YU L, *et al.* Rapid detection of heterocyclic aromatic amines in cakes by digital imaging colorimetry based on magnetic solid phase extraction with sulfonated hyper-cross-linked polymers [J]. *Food Chem*, 2022, 385: 132690.
- [22] 丁晓倩, 惠腾, 白雪, 等. UPLC-MS/MS 检测肉制品中 16 种杂环胺前处理方法筛选[J]. *食品科学*, 2021, 42(20): 230–237.
- DING XQ, HUI T, BAI X, *et al.* Screening of extraction methods for use in the detection of 16 heterocyclic amines in meat products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2021, 42(20): 230–237.
- [23] 任丹丹, 陈修红, 孙东哲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定植物油中 4 种杂环胺含量[J]. *中国油脂*, 2022, 47(11): 121–125.
- REN DD, CHEN XH, SUN DZ, *et al.* Determination of four heterocyclic aromatic amines in vegetable oils by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *China Oils Fats*, 2022, 47(11): 121–125.
- [24] GUINEZ M, CANALES R, TALIO C, *et al.* Determination of heterocyclic aromatic amines in ashes from biomass burning by UHPLC-MS/MS after ultrasound-assisted dispersive solid-liquid microextraction [J]. *Talanta*, 2020, 206: 120182.
- [25] 张志荣, 刘裕婷, 牛晓梅, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定火腿肠制品中 11 种杂环胺类化合物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(17): 6933–6939.
- ZHANG ZR, LIU YT, NIU XM, *et al.* Determination of 11 kinds of heterocyclic amines in ham sausage products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(17): 6933–6939.
- [26] CHIANG CF, LIAO PL, HSU KC, *et al.* Establishment of optimal QuEChERS conditions of various food matrices for rapid measurement of heterocyclic amines in various foods [J]. *Food Chem*, 2022, 380: 132184.
- [27] SENTELLAS S, MOYANO E, PUIGNOU L, *et al.* Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1032(1–2): 193–201.
- [28] SHENG W, ZHANG B, ZHAO Q, *et al.* Preparation of a broad-spectrum heterocyclic aromatic amines (HAAs) antibody and its application in detection of eight HAAs in heat processed meat [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(52): 15501–15508.
- [29] BHASKAR AK, NAUSHIN S, RAY A, *et al.* A high throughput lipidomics method using scheduled multiple reaction monitoring [Z]. 2022.
- [30] SCHMITT M, EGORYCHEVA M, SEUBERT A. Mixed-acidic cation-exchange material for the separation of underivatized amino acids [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1664: 462790.
- [31] WALTERS DG, YOUNG PJ, AGUS C, *et al.* Cruciferous vegetable consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in humans [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(9): 1659–1669.
- [32] WONG KY, SU J, KNIZE MG, *et al.* Dietary exposure to heterocyclic amines in a Chinese population [J]. *Nutr Cancer*, 2005, 52(2): 147–155.

(责任编辑: 韩晓红 黄周梅)

作者简介



诸力, 博士研究生, 主要研究方向食品化学安全。

E-mail: li_zhu@zju.edu.cn



章宇, 博士, 教授, 主要研究方向食品加工来源污染物危害控制。

E-mail: y_zhang@zju.edu.cn