

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.04.002

## 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定鱼类加工品中12种杂环胺类化合物

徐琦<sup>1</sup>, 杨洪生<sup>2</sup>, 吴光红<sup>2</sup>, 张美琴<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003; 2. 江苏省水产质量检测中心, 江苏 南京 210017)

**摘要:** 建立了超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定鱼类加工品中12种杂环胺类化合物(HAAs)的分析方法。经过条件优化, 肉样选用乙酸乙酯、氨水和三乙胺提取, 提取液经MCX固相萃取小柱净化, 按V(甲醇):V(氨水)=9:1洗脱, 采用Thermo Hypersil Gold C18色谱柱, 以甲醇和5 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱分离, 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 采用选择反应监测(SRM)扫描模式, 内标法进行定量分析。结果表明, 12种HAAs在1.0~100.0 μg·L<sup>-1</sup>范围内线性关系良好, 相关系数R>0.99, 在12 min内实现分离, 3个加标水平的平均回收率为42.98%~125.00% (n=6), 相对标准偏差(RSD)为1.49%~9.88%, 检测限(LOD)为0.3~1.0 μg·kg<sup>-1</sup>。该方法简便快捷, 准确度高, 易推广应用, 可作为快速测定鱼类加工品中多种HAAs的有效方法。

**关键词:** 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法; 杂环胺; 鱼类加工品

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)04-0007-09

## Simultaneous determination of 12 heterocyclic aromatic amines in fish processing products by UPLC/ESI-MS/MS

XU Qi<sup>1</sup>, YANG Hongsheng<sup>2</sup>, WU Guanghong<sup>2</sup>, ZHANG Meiqin<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Fishery Analysis and Testing Center of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China)

**Abstract:** We established a method for simultaneous determination of 12 heterocyclic aromatic amines (HAAs) in fish processing products using ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC/ESI-MS/MS). After optimizing the conditions, taking ethyl acetate, ammonia and triethylamine as extraction solutions, we purified the extract with MCX SPE column, and eluted by V(methanol):V(ammonia)=9:1. Based on a Thermo Hypersil Gold C18 column, we performed a gradient elution separation by methanol and a gradient elution with the mobile phase of 5 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate. Electrospray ionization source was applied and operated in positive ion mode, using selected reaction monitoring (SRM) scan mode and internal standard method for quantitative analysis. The results reveal that 12 HAAs show a good linear relationship within 1.0~100.0 μg·L<sup>-1</sup> (R>0.99). The separation was finished within 12 min. The average recovery (n=6) of the 12 HAAs spiked in tested samples at 3 levels ranged from 42.98% to 125.00% with the relative standard deviation (RSD) between 1.49% and 9.88%, and the limit of detection (LOD) was in the range of 0.3~1.0 μg·kg<sup>-1</sup>. This simple, rapid and highly accurate method can effectively determine various HAAs in fish processing products, easily be applied and popularized.

**Key words:** ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC/ESI-MS/MS); heterocyclic aromatic amines (HAAs); fish processing products

收稿日期: 2012-04-17; 修回日期: 2012-05-07

资助项目: 江苏省水产三项工程项目(PJ2010-52); 江苏省科技设施建设计划项目(BM2008158)

作者简介: 徐琦(1987-), 女, 硕士研究生, 从事水产品质量安全研究。E-mail: xzhjxx@sina.com

通讯作者: 吴光红, E-mail: ghwu2007@163.com

杂环胺类化合物 (heterocyclic aromatic amine, HAAs) 是一类在畜禽肉、鱼肉等蛋白质含量丰富的食物中经长时间和高温烹调加工时产生的、具有致癌和致突变性的化合物<sup>[1]</sup>。通常 HAAs 可以分为氨基咪唑类和氨基咪唑氮杂芳烃<sup>[2-6]</sup>。前一类是在 300 °C 以上的高温形成, 包括 3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶 (Trp-P-1)、3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶 (Trp-P-2)、2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶 (AaC)、2-氨基-3-甲基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶 (MeAaC)、1-甲基-9H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (Harman) 和 9H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (Norharman) 等; 第二类包括喹啉类、喹啉啉类和吡啶啉类, 这一类杂环胺被发现具有极强致突变性, 因其在普通家庭烹饪条件下 (100 ~ 225 °C) 容易形成, 在过去的 10 年间倍受关注。目前, 对于牛肉、猪肉等制品中的 HAAs 的相关研究较多, 但对于鱼类加工品中 HAAs 的形成机制则研究较少<sup>[7]</sup>, 有待进一步深入。

由于鱼类加工品中基质复杂、杂环胺种类多、含量低, 因此需要有灵敏度高的检测设备和检测技术。目前, 食品中杂环胺的检测方法有高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[2,8-10]</sup>、气相色谱法 (GC)<sup>[11]</sup>、气相色谱-质谱法 (GC-MS)<sup>[12]</sup> 和液相色谱-质谱法 (LC-MS)<sup>[13-15]</sup>。值得一提的是高效液相色谱和质谱的联用, 在分析选择性、灵敏度和专一性等方面进行了 2 种技术的优势互补, 为杂环胺的检测提供了新的技术路线, 很好地满足了当前对于鱼类加工品中杂环胺检测分析的需求, 是目前检测鱼类加工品中 HAAs 的较为精准和迅速的方法<sup>[13]</sup>。文章就超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定鱼类加工品中 12 种 HAAs 进行了系统的研究, 以内标法进行定量分析, 简化了高效液相色谱法前处理的步骤, 从而建立了快速、高效、简便的检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器

Accela 超高效液相色谱、TSQ Quantum Access Max 三重四级杆质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司出品)、Allegratm 64R 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司出品)、Caliper Turbopap LV 全自动浓缩工作站 (美国 Zymark 公司出品)、12 通道自动固相萃取装置 (德国 CNW 公司出品)、十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司出品)、Milli-Q 去离子水

发生器 (美国 Millipore 公司出品)、MCX 固相萃取柱 (500 mg/3mL) (美国 Waters 公司出品)。

### 1.2 试剂与材料

12 种 HAAs 标准品: 9H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (Norharman)、1-甲基-9H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (Harman)、3-氨基-1,4-二甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶 (Trp-p-1)、3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶 (Trp-p-2)、2-氨基-3-甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (IQ)、2-氨基-3,4-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (MeIQ)、2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (MeIQx)、2-氨基-3,4,8-三甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (4,8-DiMeIQx)、2-氨基-3,7,8-三甲基咪唑并[4,5-f]喹啉 (7,8-DiMeIQx)、2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-B]吡啶 (PhIP)、2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶 (AaC) 和 2-氨基-9H-吡啶并[2,3-b]吡啶 (MeAaC); 3 种杂环胺内标: 9H-吡啶并[3,4-b]吡啶-d7 (Norhaman-d7)、2-氨基-3,4-二甲基咪唑并[4,5-f]喹啉-d3 (MeIQ-d3) 和 3-氨基-1-甲基-5H-吡啶并[4,3-b]吡啶-13C1215N (Trp-p-2-13C1215N) 均购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司。甲醇、乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷、三乙胺均为色谱纯 (美国 TEDIA 公司出品), 其余试剂均为分析纯试剂。

试验用草鱼 6 尾, 体长为 55 ~ 60 cm, 每尾体质量约 2 500 g; 鳊 15 尾, 体长为 30 ~ 35 cm, 每尾体质量约 600 g; 鲫 25 尾, 体长为 25 ~ 30 cm, 每尾体质量约为 400 g, 均购自于南京苏果超市。

### 1.3 标准溶液的配制

分别准确称取 12 种杂环胺标准品各 5.0 mg, 以甲醇溶解定容至 50 mL, 配成质量浓度均为 100 mg·L<sup>-1</sup> 的单标储备液。分别准确称取 3 种内标 (Norhaman-d7, Trp-p-2-13C1215N, MeIQ-d3) 各 0.1 mg, 以甲醇溶解定容至 10 mL, 配成质量浓度均为 100 mg·L<sup>-1</sup> 的单标储备液。采用逐级稀释的方式, 将标准储备液配制成质量浓度为 10 μg·L<sup>-1</sup>, 20 μg·L<sup>-1</sup>, 40 μg·L<sup>-1</sup>, 80 μg·L<sup>-1</sup> 和 100 μg·L<sup>-1</sup> 的混合标准工作溶液, 内标质量浓度为 100 μg·L<sup>-1</sup>, 按照质量浓度由低到高进样, 绘制标准曲线。

### 1.4 样品前处理

选取草鱼、鲫和鳊鱼肉, 于 100 °C 水浴加热至蛋白变性成为熟鱼肉, 制成肉糜, 准确称取 2.0 g 样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 100 μL 的 1 mg

·L<sup>-1</sup>混合内标工作液,加入10 mL乙酸乙酯,3 mL氨水,1 mL三乙胺,涡旋混合5 min,10 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,将上清液转移至60 mL浓缩管中,残渣再用10 mL乙酸乙酯重复提取2次,合并上清液,于45℃下氮气吹至近干,加入2 mL甲醇,涡旋充分溶解,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min,将上清液上样于预先用5 mL的0.1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸,10 mL水和5 mL甲醇依次活化的MCX柱上,重复3次,然后用15 mL甲醇水溶液[V(甲醇):V(水)=4:6],2 mL水依次淋洗,抽干后用2 mL甲醇-氨水[V(甲醇):V(氨水)=9:1]洗脱至10 mL试管中,混匀后过0.22 μm微孔滤膜供HPLC-MS/MS分析。

### 1.5 色谱条件

Thermo Hypersil Gold C18柱(50 mm×2.1 mm, 1.9 μm),柱温为30℃,流动相A为5 mmol·L<sup>-1</sup>乙酸铵水溶液,流动相B为甲醇,采用梯度洗脱的方法,梯度洗脱程序见表1(进样体积为10 μL)。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution with mobile phases

t/min	φ(5 mmol·L <sup>-1</sup> 乙酸铵溶液)/% ammonium acetate (A)	φ(甲醇)/% methanol (B)
0	90	10
2.0	90	10
3.0	20	80
5.5	20	80
7.5	90	10
12.0	90	10

### 1.6 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子模式,喷雾电压为3 500 V,鞘气为10.5 L·min<sup>-1</sup>,辅助气为3 L·min<sup>-1</sup>,毛细管温度为380℃,碰撞气为氩气(0.2 Pa),采用选择反应监测(SRM)扫描模式。SRM模式各离子信息详见表2。

## 2 结果与分析

### 2.1 空白样品的选择

已有研究表明,富含蛋白质的食品在高温油炸、烘烤等过程中容易形成含量高低不等的杂环

表2 12种杂环胺类化合物的定性定量特征离子及优化的质谱参数

Tab.2 Qualitative and quantitative characteristic ions and optimized MS/MS parameters of 12 HAAs

杂环胺名称 compound	母离子/ (m/z) mother ion	子离子/ (m/z) daughter ion	碰撞能量/V collision energy
IQ	198.9	184.0*	27
		157.0	35
MeIQ	212.9	198.0*	27
		197.0	36
MeIQx	213.9	199.0*	28
		131.1	39
PhIP	225.0	210.0*	30
		140.0	50
4,8-DiMeIQx	227.9	213.0*	30
		212.0	50
7,8-DiMeIQx	227.9	213.0*	28
		131.1	29
Harman	182.9	115.1*	33
		89.1	51
AaC	183.9	140.1	33
		167.1*	24
Trp-p-1	197.8	181.1*	23
		154.1	29
MeAaC	197.8	197.0*	25
		181.1	24
Norharman	168.9	115.1*	34
		89.1	47
Trp-p-2	211.9	195.1*	35
		167.1	38
Norharman-d7	175.9	120.2*	35
Trp-p-2-13C12, 15N	200.9	155.1*	31
MeIQx-d3	216.9	199.0*	28

注:\*.定量离子

Note:\*.MS/MS quantitative ion

胺类物质,而通过水煮的方式则不产生或产生很少的杂环胺类物质<sup>[5,16-18]</sup>。为提高试验的可操作性和结果的准确性,故此试验选取水煮鱼肉作为空白样品,减少本底干扰。

### 2.2 样品前处理条件的优化

样品前处理在整个分析检测过程中占很重要的地位,是对杂环胺进行准确、有效测定分析的基础。下面分别就提取剂、SPE净化小柱和洗脱剂3个因素对杂环胺的前处理的提取效果进行分析。

2.2.1 提取剂的选择 因为 HAAAs 结构相似, 此试验选取了乙酸乙酯、环己烷、乙腈 3 种试剂作为提取剂分别按上述方法进行试验, 考察 3 种不同试剂的提取效果。结果表明, 乙腈沸点相对较高, 不易吹干, 所需时间过长且回收率过低; 环己烷易与肉样中的脂肪发生乳化现象, 涡旋以后溶液呈凝胶状, 离心后也无明显效果; 乙酸乙酯提取完后氮吹时最易吹干, 且杂环胺回收率高, 所以试验将乙酸乙酯选为较为合适的提取剂。同时, 鉴于杂环胺为有机碱类, 其疏水性和亲水性取决于所处介质 pH, 随着 pH 的升高, 杂环胺疏水性增强, 更易溶解于有机提取溶剂中<sup>[17]</sup>。此试验在选取乙酸乙酯的基础上适量增加了氨水和三乙胺, 考察适量的氨水和三乙胺对杂环胺的回收率的影响。结果表明, 当氨水的添加量为 3 mL, 三乙胺的添加量为 1 mL 时杂环胺的提取效果较佳。并且提取时应先加乙酸乙酯, 再加酸碱, 否则肉样容易结块, 影响提取效果。

2.2.2 SPE 净化小柱的选择 目前食品中 HAAAs 的净化方法采用 GROSS 等<sup>[18]</sup>提出的由硅藻土柱和 PRS 柱结合的方法, 但是该方法的处理过程过于复杂, 同时也会导致回收率偏低。故此, 该试验选取了 PRS、C18、MCX、HLB、纯碳和 Florisil 6 种小柱, 采用标准溶液模拟实际样品提取液来考察 6 种 SPE 柱对 12 种杂环胺的影响结果。结果显示, 内标 MeIQ-d3 在 C18 柱上损失较大, 导致部分结果偏高; 过 HLB 柱时 IQ、MeIQ、Harman、AaC 和 Trp-p-1 未能保留住; 佛罗里硅土基本上没有回收率。PRS 柱与 MCX 柱比较, MCX 柱过柱速度快于 PRS 柱, 且加标回收率较前者稳定, MCX 小柱对目标物富集性能也优于 PRS 柱。综上所述, 选用 MCX 柱较为适宜, 回收率也较好, 这与王海艳<sup>[19]</sup>和 LILLIAN 等<sup>[20]</sup>的结果相一致。

2.2.3 洗脱剂的选择 为了选择适宜的洗脱条件, 将  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  HAAAs 的标准溶液加到 MCX 柱上, 分别用  $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸、甲醇、甲醇/氨水<sup>[15]</sup>和甲醇/甲酸洗脱, 并对每一步洗脱溶液进行质谱检测。结果显示, 盐酸和甲醇洗脱液中未检测出任何目标化合物, 而一定体积分数的甲醇/氨水、甲醇/甲酸混合溶液洗脱液检出 HAAAs, 表明适当体积分数的甲醇/氨水、甲醇/甲酸的混合溶液可将目标化合物洗脱下来。试验考查了不同体积分数的甲醇与氨水、甲酸对杂环胺回收率

的影响(表 3)。结果表明, 使用不同体积分数的甲醇与甲酸, 非极性 HAAAs 均不易被洗脱下来; 而  $V(\text{甲醇}):V(\text{氨水})=9:1$  时 HAAAs 能很好被洗脱下来。

### 2.3 色谱条件的优化及选择

此试验所测的 HAAAs 结构相似, 在较高的水相比例条件下才能得到较好的分离, 故采用  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液和甲醇作为流动相。试验结果表明, 乙酸铵水溶液和甲醇的比例不同, 对 HAAAs 分离度和灵敏度存在明显的差异。当流动相中甲醇比例较高时, 流动相的洗脱强度增大, 环胺在色谱柱上的保留时间较短, 且峰形较差, 而当甲醇比例较低时, 出峰时间较晚, 峰形较好。经反复试验, 采用表 1 所述梯度洗脱程序。与传统的液相色谱相比, 在此条件下 HAAAs 有较为满意的分离度和检测灵敏度, 生物样品的本底有良好的分离, 干扰最小, 同时尝试在流动相中加入酸碱调节 pH, 使各杂环胺标样的色谱峰峰形都较好, 各峰间也都达到较好的分离。优化条件下的 12 种杂环胺的 SRM 图见图 1。

### 2.4 质谱条件的优化及确定

取质量浓度为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 12 种杂环胺标准品在质谱仪上采用注射泵以  $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  的速度进样, 调节毛细管电压和碰撞电压, 探索 12 种杂环胺标准品最佳的质谱条件。

根据 HAAAs 的结构特征, 选择正离子模式, 首先优化喷雾电压、辅助气和鞘气等质谱参数, 获得 12 种杂环胺和 3 种内标(质量浓度均为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )稳定的分子离子峰, 然后以氩气为碰撞气, 获得碎片离子质谱信息, 并进一步优化碰撞能量、毛细管温度和蒸发器温度等质谱参数使碎片离子信号强度达到最大。最后选择相对丰度最高的碎片离子作为定量离子, 次强的作为定性离子。12 种杂环胺的定性定量特征离子及优化的质谱参数见表 2。

### 2.5 线性范围

对各杂环胺的峰面积与内标的峰面积的比值及其质量浓度进行线性回归分析, 得到各目标杂环胺标样工作曲线。结果表明, 12 种 HAAAs 在  $0 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内呈良好的线性关系, 相关系数  $R > 0.99$ 。而实际肉样中单种 HAAAs 的质量分数一般在  $0 \sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  之间, 可见该方法的线性范围可满足实际样品的检测要求。

表3 不同洗脱条件及其2种比例时杂环胺回收率

Tab. 3 Recovery of HAAs with different eluents and at different ratios

%

杂环胺 HAAs	V(甲醇): V(氨水) = 8 : 2 methanol: ammonia	V(甲醇): V(氨水) = 9 : 1 methanol: ammonia	V(甲醇):V(0.1% 甲酸) = 8 : 2 methanol; 0.1% formic acid	V(甲醇):V(0.1% 甲酸) = 9 : 1 methanol; 0.1% formic acid	V(甲醇):V(0.5% 甲酸) = 8 : 2 methanol; 0.5% formic acid	V(甲醇):V(0.5% 甲酸) = 9 : 1 methanol; 0.5% formic acid
IQ	66.37	89.65	17.00	36.47	ND	66.03
MeIQ	96.08	94.90	74.10	70.46	54.17	69.87
MeIQx	93.03	108.40	99.29	34.58	85.38	26.91
PhIP	80.84	89.59	62.14	29.36	36.63	25.42
4,8-DiMeIQx	92.40	95.80	85.80	86.15	136.90	52.05
7,8-DiMeIQx	92.40	95.80	85.80	86.15	136.90	52.05
Harman	29.05	115.70	19.80	ND	ND	ND
AaC	33.25	93.87	27.52	ND	ND	ND
Trp-p-1	78.34	98.65	60.57	ND	ND	60.41
MeAaC	38.69	108.24	ND	17.31	ND	ND
Norharman	81.99	94.12	50.48	ND	ND	ND
Trp-p-2	88.70	97.20	79.60	ND	73.90	ND

注: ND. 未检出; 后表同此

Note: ND. not detected. The same case in the following table.

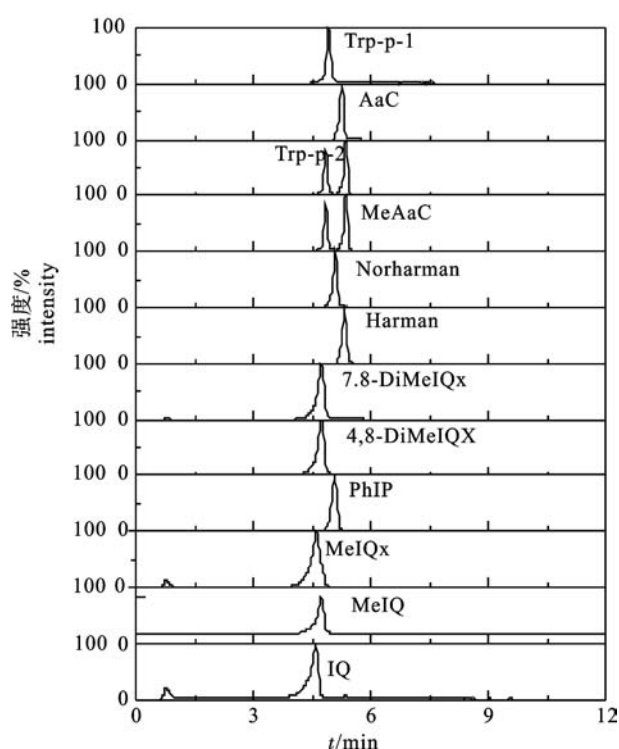


图1 优化条件下的12种杂环胺的SRM图

Fig. 1 SRM mass spectrum of 12 HAAs under optimized conditions

## 2.6 检出限

检出限(LOD)指的是产生一个能可靠地被检

出的分析信号所需要的某物质的最小浓度或含量,在计算时被认为是产生3倍信噪比的化合物的质量浓度值。选择一组质量浓度偏低的12种杂环胺标准品混合溶液,按上述方法进行分析检测,计算出该方法的检出限(表4)。

表4 方法的检出限

Tab. 4 Limits of detection of method

物质 compound	检出限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LOD
IQ	0.50
MeIQ	0.30
MeIQx	1.00
PhIP	0.30
4,8-DiMeIQx	0.40
7,8-DiMeIQx	0.40
Harman	0.30
AaC	0.40
Trp-p-1	0.50
Trp-p-2	0.50
Norharman	0.30
MeAaC	0.30

表5 空白草鱼肉样中12种杂环胺化合物的  
加标回收率和精密度( $n=6$ )

Tab. 5 Recovery and precision of 12 HAAs spiked  
in blank grass carp samples

物质 compound	加标量 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ added amount	回收率/% recovery	相对标准 偏差/% RSD
IQ	5	70.49	6.32
	10	77.80	5.73
	20	89.46	3.36
MeIQ	5	42.98	1.72
	10	57.27	7.05
	20	84.91	9.22
MeIQx	5	77.24	3.12
	10	76.04	3.17
	20	95.44	6.04
PhIP	5	62.51	8.08
	10	75.71	8.34
	20	82.28	6.77
4,8-DiMeIQx	5	68.92	4.61
	10	78.08	6.64
	20	78.78	7.93
7,8-DiMeIQx	5	68.92	4.61
	10	78.08	6.64
	20	78.78	7.93
AaC	5	51.90	7.45
	10	57.85	1.74
	20	90.87	5.71
Harman	5	83.10	9.88
	10	94.05	5.08
	20	125.0	9.26
Norharman	5	63.44	7.38
	10	81.39	3.44
	20	87.38	4.18
Trp-p-2	5	64.61	4.61
	10	79.03	1.66
	20	83.20	9.03
Trp-p-1	5	50.08	1.49
	10	79.75	5.08
	20	83.06	3.11
MeAaC	5	52.45	1.49
	10	92.53	7.59
	20	95.38	5.38

表6 空白鲫鱼肉样中12种杂环胺化合物的加标  
回收率和精密度( $n=6$ )

Tab. 6 Recovery and precision of 12 HAAs spiked  
in blank crucian carp samples

物质 compound	加标量 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ added amount	回收率/% recovery	相对标准 偏差/% RSD
IQ	5	73.48	2.37
	10	77.92	2.88
	20	89.55	3.65
MeIQ	5	52.69	2.25
	10	62.35	3.34
	20	94.60	5.41
MeIQx	5	76.86	4.42
	10	85.10	3.75
	20	96.39	3.98
PhIP	5	66.82	2.58
	10	74.92	1.94
	20	95.39	5.87
4,8-DiMeIQx	5	67.58	3.31
	10	72.33	4.27
	20	78.82	5.48
7,8-DiMeIQx	5	67.58	3.31
	10	72.33	4.27
	20	78.82	5.48
AaC	5	58.16	6.06
	10	66.90	4.93
	20	92.02	5.15
Harman	5	88.99	4.07
	10	93.57	4.53
	20	104.67	5.58
Norharman	5	62.97	3.41
	10	77.54	5.92
	20	82.41	2.53
Trp-p-2	5	64.92	4.59
	10	80.35	1.76
	20	88.20	2.31
Trp-p-1	5	69.36	3.13
	10	80.90	2.58
	20	98.92	2.75
MeAaC	5	61.20	1.58
	10	89.33	2.15
	20	97.18	4.96

表7 空白鳊鱼肉样中12种杂环胺化合物的加标回收率和精密度( $n=6$ )

Tab.7 Recovery and precision of 12 HAAs spiked in blank white bream samples

物质 compound	加标量 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ added amount	回收率/% recovery	相对标准 偏差/% RSD
IQ	5	75.53	1.72
	10	88.52	2.82
	20	92.01	2.24
MeIQ	5	50.20	4.47
	10	64.23	3.95
	20	83.30	6.23
MeIQx	5	76.86	5.35
	10	87.43	4.21
	20	96.80	6.72
PhIP	5	64.82	4.43
	10	78.35	1.76
	20	85.53	2.23
4,8-DiMeIQx	5	69.92	2.18
	10	76.33	4.51
	20	85.46	5.57
7,8-DiMeIQx	5	69.92	2.18
	10	76.33	4.51
	20	85.46	5.57
AaC	5	53.47	1.85
	10	58.38	2.23
	20	97.99	3.32
Harman	5	82.71	3.72
	10	99.54	3.88
	20	115.95	4.07
Norharman	5	67.29	3.48
	10	80.40	4.12
	20	86.27	1.78
Trp-p-2	5	64.50	1.86
	10	80.22	3.71
	20	85.16	2.97
Trp-p-1	5	72.45	1.98
	10	85.76	3.83
	20	96.55	2.89
MeAaC	5	55.88	4.81
	10	92.74	3.53
	20	102.10	2.29

## 2.7 样品加标的回收率与精密度

选取草鱼、鲫鱼和鳊鱼肉,于100℃水浴加热至蛋白变性成为熟鱼肉,作为空白样品,分别添加HAAs为 $5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $20\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 3个水平的标准品,按1.3、1.4和1.5所述方法进行加标回收率测定,每个加标水平平行测定6次。结果显示,12种HAAs的加标回收率为42.98%~125%(表5、表6和表7)。从结果看部分化合物回收率偏低,这可能是选取的内标种类偏少,无法使每个化合物均有相应的同位素内标造成的。在各个加标水平下,加标回收率比较稳定,相对标准偏差(RSD)为1.49%~9.88%,其精密度可满足加工水产品中的含量检测要求。

## 2.8 实际样品的检测

应用笔者所建立的方法对炸鱼肉、烤鱼肉2种不同加工方式的鱼类产品中的HAAs质量分数进行了测定,结果显示,2种加工制品中均能检测出HAAs,其中炸鱼肉中的质量分数较高(表8)。图2为炸鱼肉样品的谱图。

表8 炸鱼肉、烤鱼肉样品中杂环胺类化合物质量分数( $n=3$ )

Tab.8 Content of HAAs in fried and roasted samples  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

化合物 compound	$w$ (油炸样品) fried sample	$w$ (烧烤样品) roasted sample
IQ	5.03	1.92
MeIQ	4.65	1.23
MeIQx	1.69*	1.56*
PhIP	0.51*	ND
4,8-DiMeIQx	1.10*	ND
7,8-DiMeIQx	1.10*	ND
AaC	ND	ND
Harman	13.29	10.08
Norharman	26.85	26.46
Trp-p-2	ND	ND
Trp-p-1	ND	ND
MeAaC	ND	ND

注:\*.高于检出限而低于定量限

Note: \*. beyond the limit of detection but under the limit of quantification

## 3 结论

通过对提取剂、固相萃取小柱,洗脱剂、色谱

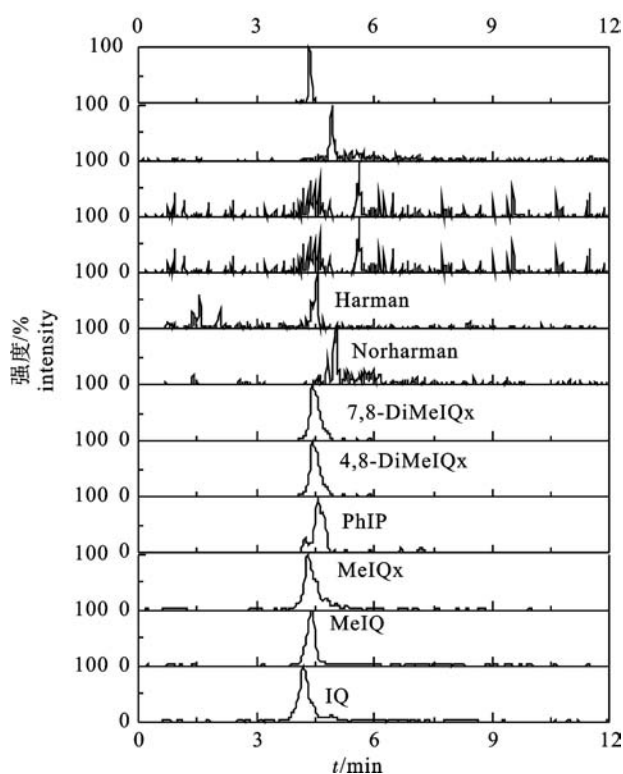


图2 炸鱼肉样品中杂环胺类化合物检测的谱图

Fig. 2 Mass spectrum of HAAs in a fried sample

条件及质谱条件等试验条件的选择和优化,建立了超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定鱼类加工品中12种HAAs新的分析方法。通过对该方法的线性范围、检出限、回收率和精密度的验证,确定该方法符合实际样品检测的要求,易于推广应用。

### 参考文献:

- [1] 廖国周, 张英君, 徐幸莲, 等. 传统肉制品中杂环胺的HPLC测定[J]. 南京农业大学学报, 2008, 4(3): 134-139.  
LIAO Guozhou, ZHANG Yingjun, XU Xinglian, et al. Detection of heterocyclic aromatic amines in traditional meat products by HPLC [J]. J Nanjing Agric Univ, 2008, 4(3): 134-139. (in Chinese)
- [2] 廖倩, 杨文侠, 李开雄. 烹调食品中杂环胺检测的样品前处理方法研究[J]. 肉类研究, 2008, 10(4): 61.  
LIAO Qian, YANG Wenxia, LI Kaixiong, et al. Sample pretreatment for heterocyclic amines determination in cooked foods [J]. Meat Res, 2008, 10(4): 61. (in Chinese)
- [3] 吴永宁. 烹调食物中蛋白质、氨基酸热解产物——杂环胺 I. 致癌性和致突变性[J]. 国外医学卫生学分册, 1993, 20(5): 282.  
WU Yongning. Protein and pyrolysis products in cooked food: heterocyclic aromatic amines. I. Mutagenicity and carcinogenicity [J]. Foreign Med Sci: Section Hygiene, 1993, 20(5): 282. (in Chinese)

nese)

- [4] 冯云, 彭增起, 崔国梅. 烘烤对肉制品中多环芳烃和杂环胺含量的影响[J]. 肉类工业, 2009, 340(8): 27-30.  
FENG Yun, PENG Zengqi, CUI Guomei, et al. Influences of grilling on content of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic amine in meat product [J]. Meat Ind, 2009, 340(8): 27-30. (in Chinese)
- [5] PILAR P, MARK G, KNIZE B. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods [J]. J Chromatogr B, 2000, 47(7): 139-169.
- [6] TOMS B, GIL M, CREMIN P, et al. HPLC-DAD-ESIMS and analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(10): 4748-4760.
- [7] CHRISTOPHER J S, XIAO L Q, QING M Z, et al. Analysis of  $\alpha$  and  $\beta$  carbolines in mainstream smoke of reference cigarettes by gas chromatography mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1046(1/2): 211-216.
- [8] KATAOKA H, HISHIOKA S, KOBAYASHI M, et al. Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked food samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector [J]. Food Chem Toxicol, 2002, 69(5): 682-689.
- [9] 吕美, 曾茂茂, 陈洁. 烹调肉制品中杂环胺的检测技术和控制手段研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 345-348.  
LÜ Mei, ZENG Maomao, CHEN Jie. Research progress of detection and inhibition of heterocyclic amines in cooked meat [J]. Food Sci, 2011, 32(13): 345-348. (in Chinese)
- [10] 杨贤庆, 翟红蕾, 郝淑贤, 等. 高效液相色谱法测定生物胺衍生条件的优化研究[J]. 南方水产科学, 2012, 8(1): 49-53.  
YANG Xianqing, ZHAI Honglei, HAO Shuxian, et al. Optimization for determining derivative conditions of biogenic amines by HPLC [J]. South China Fish Sci, 2012, 8(1): 49-53. (in Chinese)
- [11] PAIS P, MOYANO E, PUIGNOU L, et al. Liquid chromatography atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as routine method for the analysis of mutagenic heterocyclic amines in beef extract [J]. J Chromatogr A, 1997, 778(1/2): 207-218.
- [12] CHENG K W, CHEN F, WANG M. Heterocyclic amines: chemistry and health [J]. Mol Nutr & Food Res, 2006, 50(12): 1150-1170.
- [13] 吴永宁. 烹调食物中蛋白质、氨基酸热解产物——杂环胺 II. 形成机制, 检测方法和含量水平[J]. 国外医学卫生学分册, 1993, 20(5): 283-290.  
WU Yongning. Protein and pyrolysis products in cooked food: heterocyclic aromatic amines. II. Formation mechanism, detection methods and content [J]. Foreign Med Sci: Section Hygiene, 1993, 20(5): 283-290. (in Chinese)
- [14] 蒋智, 赵广华, 胡小松. 鸡肉中2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶前处理条件优化及液相色谱串联四级杆质谱检测[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 326-329.  
JANG Zhi, ZHAO Guanghua, HU Xiaosong. Optimization of



- sample preparation procedure and determination of 2-amino-1-methyl-6-phenyl-imidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) in chicken by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Sci Technol Food Ind*, 2009, 30(10): 326-329. (in Chinese)
- [15] 朱世超, 钱卓真, 吴成业. 水产品中7种大环内酯类抗生素残留量的HPLC-MS/MS测定法[J]. *南方水产科学*, 2012, 8(1): 54-60.
- ZHU Shichao, QIAN Zhuozhen, WU Chengye. Determination of 7 macrolide antibiotic residues in aquatic products by HPLC-MS/MS [J]. *South China Fish Sci*, 2012, 8(1): 54-60. (in Chinese)
- [16] SOLYAKOV A, SKOG K. Screening for heterocyclic amines in chicken cooked in various ways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2002, 40(8): 1205-1211.
- [17] 邵斌, 彭增起, 杨洪生, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定传统禽肉制品中的9种杂环胺类化合物[J]. *色谱*, 2011, 29(8): 755-761.
- SHAO Bin, PENG Zengqi, YANG Hongsheng, et al. Simultaneous determination of 9 heterocyclic aromatic amines in poultry products by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(8): 755-761. (in Chinese)
- [18] GROSS G A, GRUTE A. Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products [J]. *J Chromatogr A*, 1992, 592(1/2): 271-278.
- [19] 王海艳, 赵阁, 谢复炜, 等. HPLC-MS/MS检测卷烟主、侧流烟气中的杂环胺[J]. *烟草化学*, 2010(2): 31-34.
- WANG Haiyan, ZHAO Ge, XIE Fuwei, et al. Determination of heterocyclic aromatic amines in mainstream and sidestream cigarette smoke by HPLC-MS/MS [J]. *Tobacco Chem*, 2010(2): 31-34. (in Chinese)
- [20] DEBRUIN LS, MARTOS P A, JOSEPHY P D. Detection of PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b] pyridine) in the milk of healthy women [J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(11): 1523-1528.