

# UPLC-MS/MS 方法评估人对食物中杂环胺的摄入

杨婉琪<sup>1</sup>, 彭利娟<sup>1\*</sup>, 王亚南<sup>2\*</sup>, 李青<sup>1</sup>, 陈季旺<sup>1</sup>, 吴波<sup>1</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 农产品加工与转化湖北省重点实验室, 湖北武汉 430023)

(2. 南京医科大学姑苏学院, 苏州市立医院, 南京医科大学附属苏州医院, 江苏苏州, 215002)

**摘要:** 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 技术, 建立了人体摄入吸收后的食物致癌物杂环胺 (HAAs) 与血清白蛋白 (HSA) 形成的亚磺酰胺加合物的准确、高灵敏度检测方法, 用于评估 HAAs 的摄取, 研究 HAAs 与相关癌症风险的关系。选取 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-b]吡啶 (PhIP) 为研究对象, 依据 PhIP 在人体内的代谢途径, 体外合成 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物。使用 UPLC-MS/MS 检测 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的酸水解产物 PhIP, 对 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物进行定量。结果表明, HiTrap Blue 亲和柱对 HSA 的回收率高于 90%; 优化的条件下, PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的水解效率高达 96%; PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的含量与 PhIP 的信号强度呈良好线性关系; 线性回归方程是  $y=1.0117x+3.2563$ ,  $R^2=0.9987$ 。该方法的检测限和定量限分别低至  $5\times 10^{-3}$  fmol/mg HAS 和  $1.50\times 10^{-3}$  fmol/mg HSA。该方法对人血浆中 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的测定具有较高的灵敏度, 在 HAAs 摄入与相关癌症风险关系的研究中, 是用于评估常食用熟肉个体的 HAAs 摄入的可行方法。

**关键词:** 杂环胺; 加合物; 人血清白蛋白; 超高效液相质谱联用法

文章编号: 1673-9078(2023)01-320-325

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.1.0228

## Evaluation of Human Exposure to Food-borne Heterocyclic Aromatic Amines using UPLC-MS/MS

YANG Wanqi<sup>1</sup>, PENG Lijuan<sup>1\*</sup>, WANG Ya'nan<sup>2\*</sup>, LI Qing<sup>1</sup>, CHEN Jiwang<sup>1</sup>, WU Bo<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan 430023, China)

(2.Department of Clinical Laboratory, The Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou Municipal Hospital, Gusu School, Nanjing Medical University, Suzhou 215002, China)

**Abstract:** An accurate and highly sensitive assay was developed for the determination of sulfinamide adducts formed by heterocyclic aromatic amines (HAAs) and human serum albumin (HSA) after human ingestion and absorption, using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The aim of this study was to assess exposure to HAAs, and further investigate the related cancer risks. Using 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) as a research subject, the PhIP-HSA sulfinamide adduct was synthesized *in vitro* according to the metabolic pathway of the human body and was quantified using UPLC-MS/MS based on the detection of PhIP derived from its acid hydrolysis. The results showed that the recovery of HSA by the HiTrap Blue affinity columns was greater than 90%, and the hydrolysis efficiency of the PhIP-HSA sulfinamide adduct reached 96% under optimized conditions. There was a positive linear relationship between the PhIP-HSA sulfinamide adduct content and the signal intensity of PhIP, and the linear regression equation was  $y=1.0117x+3.2563$ ,  $R^2=0.9987$ . The respective detection and quantitation limits for the PhIP-HSA sulfinamide adduct in plasma were as low as  $5\times 10^{-3}$  fmol/mg HSA and

引文格式:

杨婉琪,彭利娟,王亚南,等. UPLC-MS/MS 方法评估人对食物中杂环胺的摄入[J].现代食品科技,2023,39(1):320-325

YANG Wanqi, PENG Lijuan, WANG Yanan, et al. Evaluation of human exposure to food-borne heterocyclic aromatic amines using UPLC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1): 320-325

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21405118)

作者简介: 杨婉琪 (1997-), 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 517452773@qq.com

通讯作者: 彭利娟 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: lijuan\_peng@hotmail.com; 共同通讯作者: 王亚南 (1980-), 女, 博士,

副主任技师, 研究方向: 肿瘤新型标志物的检测, E-mail: wyn80520@163.com

$1.50 \times 10^{-3}$  fmol/mg HSA. This method showed a high degree of sensitivity when determining PhIP-HSA sulfonamide adducts in human plasma, and proved to be a feasible method for the evaluation of exposure to HAAs in individuals who frequently eat cooked meat, as well as the associated cancer risks.

**Key words:** heterocyclic aromatic amine; adduct; human serum albumin; UPLC-MS/MS

杂环胺 (HAAs) 是鱼肉、红肉、禽肉等高蛋白食物在热加工过程中以及一些烟草在燃烧时产生的一类多环芳香族化合物, 对于人类及锯齿类动物具有致癌和致突变性。迄今为止已分离出了 20 种食源性 HAAs<sup>[1]</sup>。一些流行病学研究报告显示, 频繁食用熟肉与结直肠癌、胰腺癌和前列腺癌风险升高之间存在一定关联<sup>[2-5]</sup>。由于人们的饮食结构和饮食习惯存在差异, 且食物种类、烹制方式、加工时间、外源添加物等对熟肉中 HAAs 的含量影响极大<sup>[6-9]</sup>。目前无法对长期摄入的 HAAs 进行有效地定量评估, 因而熟肉中产生的 HAAs 与癌症风险之间的联系也一直难以确定。目前常见的生物标记物有 HAAs 在尿液中的代谢物、毛发中的 HAA、DNA-HAA 加合物和蛋白质-HAA 加合物, 但尿液中的代谢物反应 HAAs 摄入周期有限, 而毛发中的 HAAs 易受化学剂影响, DNA 又具有自我修复能力。近年来, 通过确立稳定的、长期的生物标记物对 HAAs 的摄入进行定量评估, 以研究 HAAs 与癌症风险的关系备受期待。

2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-*b*]吡啶 (PhIP) 是煎烤红肉过程中产生最多的 HAAs<sup>[10]</sup>。国际癌症研究机构 (IARC) 早已将 PhIP 定义为潜在人类致癌物 (2B 级)<sup>[11]</sup>。人体内的 PhIP 在细胞色素 P450 的作用下 N-羟基化, 再经 II 期酶的进一步激活产生 nitrenium 离子, 然后与 DNA 反应诱发变异; N-羟基化的 PhIP 代谢物 (HONH-PhIP) 也能在细胞色素 P450 或过渡金属的作用下氧化生成 N-亚硝化代谢物 (NO-PhIP)。PhIP 的 N-氧化代谢物能与人血清白蛋白 (HSA) 34 号位的半胱氨酸残基 (Cys<sup>34</sup>) 结合形成 PhIP-HSA 加合物<sup>[4,5]</sup> (图 1)。其中, PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物为主要的 HSA 加合产物, 且在酸碱条件下不稳定性, 易水解产生 PhIP。本研究依据 PhIP 在人体内的代谢途径, 于体外合成 PhIP-HSA 加合物, 通过高灵敏度的超高效液相色谱质谱联用法 (UPLC-MS/MS) 对 PhIP-HSA 加合物水解产物 PhIP 的定量, 进而推测人血浆中的 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的含量。以期通过人血浆中的 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物评估 HAAs 的摄入与相关癌症风险的关系。

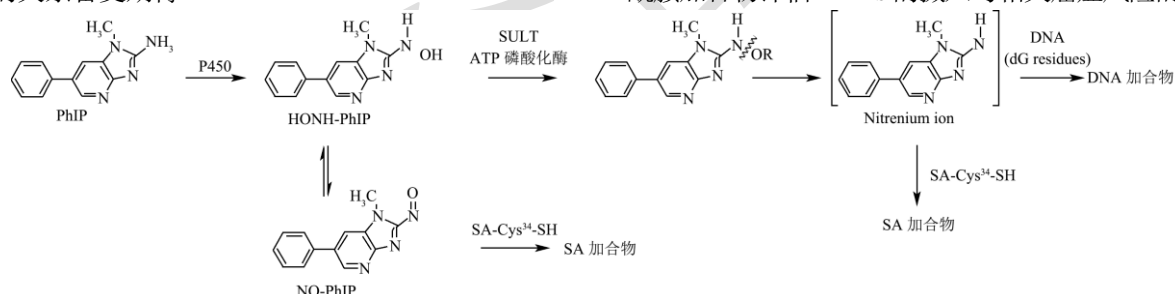


图 1 PhIP 人体内的代谢途径

Fig.1 Metabolic pathway of PhIP in human body

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要材料

HRP 固相萃取小柱 (10 mg/1 mL) Pierce 白蛋白去除树脂和 Aquasil C18 反相柱 (2.1×150 mm, 3 μm) 购自美国 Thermo 公司。Amicon@Ultra-0.5-10 K 超滤离心管购自美国 Millipore 公司。HiTrap Blue HP (5×1 mL) 购自美国 Cytiva 公司。PD-10 柱购自 GE 公司。

健康人血浆样本由南京医科大学附属苏州医院提供。

#### 1.1.2 试剂

PhIP 及 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑并[4,5-*b*]吡啶

-d<sub>3</sub> ([<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-PhIP, 同位素纯度 99%) 购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司。HSA、水合肼 (50%~60%) 以及碳负载钯催化剂 (Pd/C, 10%) 购自美国 Sigma 公司。LC-MS 级甲醇、乙腈、水和甲酸 (50%) 购自美国 Thermo 公司。生物纯二甲基亚砜 (DMSO)、色谱级乙酸、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 和无水四氢呋喃 (THF) 购自阿拉丁化学试剂有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器设备

高效液相色谱采用美国 Thermo UtiMate 3000 UPLC 系统, 美国 Thermo 公司的 Q Exactive 高分辨率质谱仪, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司的 MX-S 漩涡混匀仪, 上海康敏检验设备有限公司的 MTC-100 恒温混匀仪, 上海安亭科学仪器厂 TGL-16C

台式离心机, ZLS-1 真空离心浓缩仪, Evolution 220 扫描型紫外可见分光光度计。

## 1.2 方法

### 1.2.1 人血浆中 HSA 的提取

#### 1.2.1.1 HiTrap blue 柱 (1 mL) 提取白蛋白

取 200  $\mu$ L 血浆与 4 mL A (50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 值 7.0) 在 15 mL 离心管中混匀, 然后 3 000 r/min 离心 5 min, 取上层清液。上样前使用 10 mL A 液平衡 HiTrap Blue 小柱, 然后以 1 mL/min 的速度上样。上样后 10 mL A 洗脱杂质, 最后用 3 mL B (50 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 mol/L KCl, pH 值 7.0) 洗脱 HSA, 并收集。

#### 1.2.1.2 Pierce 白蛋白去除树脂提取白蛋白

取 0.4 mL 树脂液于微量离心柱中, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃掉废液。向柱中加入 200  $\mu$ L Tris 缓冲液 (25 mmol/L Tris, 75 mmol/L NaCl, pH 值 7.5), 12 000 r/min 离心 1 min, 弃掉废液。取 40  $\mu$ L 血浆加入柱中, 室温放置 2 min 后, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃掉废液。加入 50  $\mu$ L Tris 缓冲液洗脱杂质, 并重复四次。最后加入 200  $\mu$ L B, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集洗脱液。

#### 1.2.1.3 Amicon<sup>®</sup>Ultra-0.5-10K 脱盐

将洗脱液移入 Amicon<sup>®</sup>Ultra-0.5-10K 超滤离心管中, 15 000 r/min 离心 15 min, 弃掉废液。然后用超纯水洗涤样品 2 次, 15 000 r/min 离心 15 min, 弃掉废液。收集超滤离心管里的样品, 40  $^{\circ}\text{C}$  下真空旋干。

### 1.2.2 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的酸水解

#### 1.2.2.1 PhIP-HSA 加合物的制备

PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的制备方法参考文献并作了一定调整<sup>[12,13]</sup>。首先 PhIP 与  $\text{NaNO}_2$  反应生成硝化代谢物 ( $\text{NO}_2$ -PhIP)。随后, 以 Pd/C 为催化剂, 通过还原  $\text{NO}_2$ -PhIP 合成 HONH-PhIP。

取 2 mg HSA 溶于 1 mL 10 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 值 7.4), 加入 30 nmol HONH-PhIP (HSA: HONH-PhIP 的摩尔比=1:1) 充分混合。混合液 40  $^{\circ}\text{C}$  下反应 18 h。反应结束后, 使用 PD-10 柱子去除未反应的 PhIP 代谢物。根据加合物在 320 nm 的吸收对其进行初步定量。

#### 1.2.2.2 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的酸水解

于 2 mL 离心管中加入 75 fmol PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物和 100 fmol [ $^2\text{H}_3$ ]-PhIP。使用 12 mol/L 盐酸调节其盐酸浓度, 然后 37  $^{\circ}\text{C}$  下反应。反应结束后, 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至~10, 再用乙酸乙酯萃取。萃取液真空浓缩至约 0.1 mL, 加 1 mL 超纯水稀释。

#### 1.2.2.3 PhIP 的固相萃取

HRP 固相萃取小柱预先用 1 mL 甲醇和 1 mL 超纯水预洗。样品以 1 mL/min 注入 HRP 小柱上后, 2 mL 10% 甲醇水溶液洗杂质, 1 mL 的甲醇洗脱 PhIP 并收集。洗脱液真空浓缩至全干。加入 30  $\mu$ L 50% DMSO 复溶。

### 1.2.3 UPLC-MS/MS 的分析

使用美国 Thermo 公司 Hypersil GOLD C18 色谱柱 (2.1 $\times$ 100 mm, 3  $\mu$ m 粒径) 在 UltiMate 3000 UPLC 系统上对 PhIP 进行色谱分析。流动相 A 为  $\phi$ =0.01% 甲酸, 5% 乙腈水溶液; B 为 0.01% 甲酸, 95% 乙腈。流速设置为 200  $\mu$ L/min, 洗脱梯度: 0~1 min 100% A 到 35% B, 6 min 到达 100% B, 并保持 100% B 2 min。

使用高分辨率质谱仪 Q Exactive (美国 Thermo 公司) 在正电离模式下采集质谱。鞘气流速 25 mL/min; 辅助气流速 15 mL/min; 喷雾电压 3.50 kV; 毛细管温度设定为 320  $^{\circ}\text{C}$ 。碰撞能为 35。监测反应离子和保留时间 ( $t_R$ ) 如下: PhIP ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )  $m/z$  225.10 > 210.09; [ $^2\text{H}_3$ ]-PhIP ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ )  $m/z$  228.1 > 210.09,  $t_R$ =5.63 min。碎片离子的  $m/z$  容差设置为  $5\times 10^{-6}$ , 保留时间的偏差不得超过 5%。

#### 1.2.4 方法验证

检测方法在特异性、回收率、准确度、精密度和线性方面加以验证。通过监测阴性对照样品的潜在干扰离子信号, 研究方法的特异性。

取 78  $\mu\text{g/mL}$  的 PhIP 标准储备液, 用  $\phi$ =50% DMSO 配制 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10 nmol/L 系列浓度的 PhIP 标准液绘制标准曲线。

于 300  $\mu$ L HSA (10 mg) 水溶液中, 分别加入 0.20~200 fmol PhIP, 其中未加 PhIP 的 HSA 样品用作阴性对照。每个浓度进行三次平行试验。于各样品中加入适量的 12 M 盐酸, 使其终浓度为 0.16 mol/L。37  $^{\circ}\text{C}$  下水解 1 h; 反应完成后, 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 10, 乙酸乙酯萃取。萃取液真空浓缩后, 加 1 mL 超纯水进行固相萃取, 50% DMSO 复溶待测。

#### 1.2.5 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的定量分析

取 300  $\mu$ L HSA (10 mg) 水溶液, 分别加入 0、10、25、50、100、200 fmol PhIP-HSA 加合物和 100 fmol [ $^2\text{H}_3$ ]-PhIP。0.16 mol/L HCl, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 水解 1 h。经乙酸乙酯萃取及固相萃取后, 加入 30  $\mu$ L 50% DMSO 复溶。使用 UPLC-MS/MS 检测。

#### 1.2.6 数据处理

使用 Xcalibur 4.0 版和 Microsoft Excel 进行数据处理。定量分析在选择反应监测 (SRM) 扫描模式下进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 HSA 的提取方法对比

在对人血浆样本中 HSA 的提取对比发现, HiTrap Blue 亲和柱的 HSA 提取量要稍高于 Pierce 白蛋白去除树脂的 HSA 提取量, 大约高 8% 左右。而回收实验结果显示, HiTrap Blue 亲和柱对 HSA 的回收率高于 90%, 实验的相对误差小于 5%。另外, HiTrap Blue 亲和柱可以重复使用, 在检测成本方面要远低于 Pierce 白蛋白去除树脂。因而在实际血浆样品处理时, 选择使用 HiTrap Blue 亲和柱。

### 2.2 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的酸水解条件

通过调整酸水解的盐酸浓度和反应时间得出优化的酸水解条件: 盐酸浓度为 0.16 mol/L; 反应时间: 1 h。在优化的条件下, PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的水解效率高达 96%, 相对偏差 3.30%。重复性好。

### 2.3 加标回收率

表 1 加标回收率

Table 1 Spike recovery

PhIP 添加量/fmol	PhIP 实测量/fmol	回收率/%
0.20	0.29±0.02	145.63±11.58
0.40	0.42±0.04	103.92±9.86
0.80	0.58±0.02	72.10±2.84
2.00	1.17±0.11	58.59±5.33
4.00	2.10±0.13	52.39±3.13
5.00	2.87±0.32	57.32±6.45
10.00	5.79±0.67	57.87±6.72
25.00	16.80±1.39	67.21±5.55
50.00	38.52±1.98	77.04±3.96
200.00	183.10±4.24	91.55±2.14

注: 结果均以平均值±标准偏差表示。

由于未加 PhIP 的阴性对照样品中没有检测到任何干扰信号, 说明该检测方法具有特异性。样品中

PhIP 的量在 5~200 fmol (1.12~44.80 pg) 时, 其回收率在 57%~92% 之间 (表 1)。PhIP 的结构中含有苯环等相关官能团, 在塑料离心管及玻璃进样瓶中均会发生一定的吸附。因而, 当样品中 PhIP 处于较低含量的范围时, PhIP 的吸附损耗对 PhIP 的回收率的影响随样品中 PhIP 含量的减少而逐步明显, 导致 PhIP 的回收率随样品中 PhIP 含量的减少而呈现明显的下降趋势。然而, 当样品中 PhIP 的含量接近方法的检测限时, 仪器的噪音对 PhIP 信号的干扰逐渐增大, PhIP 的回收率呈现假增高趋势。因此, 为了提高检测方法的准确性, 在实际样品分析时, PhIP 同位素标记的化合物 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-PhIP 作为内标添加到样品中对定量结果进行校正。

根据加标数据绘制 PhIP 的校正标准曲线。PhIP 的含量与其定量离子的信号强度 (峰面积) 呈现良好的线性关系, 回归方程为  $y=149\ 086x-9\ 903.2$ , 相关系数  $R^2=1$ 。

HiTrap Blue 亲和柱对 HSA 的回收率 > 90%, 且 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的水解效率高达 96%。通过信噪比 3 (S/N=3) 和 10 (S/N=10) 分别对血浆中 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的检测限和定量限进行估算, 检测限低至  $5\times 10^{-3}$  fmol/mg HSA, 定量限低至  $1.50\times 10^{-3}$  fmol/mg HSA。

### 2.4 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物加合物的定量

#### 分析

同日及异日分析的所有样品中内标 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-PhIP 的回收率均在 70%~77% 之间, 这说明方法的重复性及精密密度均良好。

不同浓度 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物样品的 UPLC-MS/MS 检测结果如表 2 所示。PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的含量与 PhIP 的信号强度呈现线性正相关,  $y=1.011\ 7x+3.256\ 3$ ,  $R^2=0.998\ 7$ , 满足定量分析标准。PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的实际检测量与理论添加量的误差均 < 13%, 在误差可容范围内。

表 2 UPLC-MS/MS 检测 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物

Table 2 Determination of the PhIP-HSA sulfinamide adduct by UPLC-MS/MS

加合物理论添加量/fmol	PhIP 实测量/fmol	加合物含量/fmol/mg HSA
10.00	11.11±0.84	1.11±0.08
25.00	26.87±4.77	2.69±0.48
50.00	56.19±2.52	5.62±0.25
100.00	108.15±5.95	10.82±0.60
200.00	203.48±8.11	20.35±0.81

注: 结果均以平均值±标准偏差表示。

## 2.5 讨论

现有流行病学研究的数据尚不足以对 HAAs 摄取与相关癌症之间的关系进行有效评估。食用熟肉后, 其中的 HAAs 通过消化吸收进入血液, 在酶的作用下经系列代谢与 HSA 结合形成加合物。因此 HAA-蛋白质加合物的含量要远低于食物中 HAAs 的含量, 因此对于检测方法灵敏度的要求要远高于检测食品中 HAA 的检测要求。通过选择稳定、可长期存在的 HAAs 生物标记物来对饮食摄入的 HAAs 进行定量, 将有助于癌症风险的评估。目前, 在研究的 HAAs 生物标记物较多, 包括尿液中 HAAs 的相关代谢物、毛发中沉积的 HAAs、HAAs 与 DNA 形成加合物以及 HAAs 的蛋白质加合物等<sup>[14-16]</sup>。从理论上来说, 选择标靶组织中 HAA-DNA 加合物作为生物标记物评估 HAAs 的致癌风险最为直观合理。但对此类 HAA-DNA 加合物的研究极大地受限于人体活检标本的采集。血浆中 HSA 含量高 3.40~5.40 g/dL, 在长期摄入 HAAs 的情况下, 血浆中形成的 HAA-HSA 加合物可能会在 HSA 的生命周期内进行积累。因此人血中 HAA-HSA 加合物可能相对容易进行定量检测。

使用加速器质谱技术检测 PhIP-HSA 加合物的研究发现, 摄入 70~84  $\mu\text{g}$  PhIP (相当于 175 g 的熟鸡肉的 PhIP 量) 的 24 h 后, 人血中每毫克 HSA 所含的加合物量在飞摩尔级 (fmol) 水平最高可达到 20.81 fmol PhIP/mg HSA<sup>[17]</sup>。Bellamri 等<sup>[10]</sup>的研究也发现, 随着熟肉摄入的增加, 人血中 PhIP-HSA 加合物的含量显著增加。同时, 随着熟肉的持续食用, 人血中 PhIP-HSA 加合物有一定程度的积累。本研究通过优化血浆中蛋白质的提取方法和酸水解条件等手段, 建立了高灵敏度的血浆中 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的 UPLC-MS/MS 方法。方法在一定程度节省检测成本及检测时间的同时, 可以对人血中高于  $5 \times 10^{-3}$  fmol/mg HSA 浓度的 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物进行有效检测, 比文献检测方法的灵敏度提高了 7~8 倍<sup>[10]</sup>。考虑到目前血浆样本的取样量仅 200  $\mu\text{L}$ , 如果适当增加血浆的用量至 1 mL, PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的检测限应该可以再降低 5 倍。在研究食物致癌物 HAAs 与相关癌症风险的关系时, 使用该方法评估常食用熟肉的健康人及肠癌患者的 HAAs 摄入是较为可行的。

## 3 结论

本研究采用 UPLC-MS/MS 技术, 建立了食物致癌物 HAAs 与 HSA 形成的亚磺酰胺加合物的准确、

高灵敏度检测方法。在对人血浆样本中 HSA 的提取对比发现, HiTrap Blue 亲和柱对 HSA 的回收率 >90%, 在盐酸浓度为 0.16 mol/L, 反应时间为 1 h 的情况下, PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的水解效率高达 96%。样品中 PhIP 的量在 5~200 fmol (1.12~44.80  $\mu\text{g}$ ) 时, 其回收率在 57%~92% 之间, PhIP 的回收率随样品中 PhIP 含量的减少明显降低, 样品中内标 [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-PhIP 的回收率均在 70%~77%。通过信噪比 3 (S/N=3) 和 10 (S/N=10) 分别对血浆中 PhIP-HSA 亚磺酰胺加合物的检测限和定量限进行估算, 检测限低至  $5 \times 10^{-3}$  fmol/mg HSA, 定量限低至  $1.50 \times 10^{-3}$  fmol/mg HSA。所以, 该方法可以在节约样本的基础上具有特异性的检测 HAAs 与 HSA 形成的亚磺酰胺加合物。

## 参考文献

- [1] Nadeem H R, Akhtar S, Ismail T, et al. Heterocyclic aromatic amines in meat: formation, isolation, risk assessment, and inhibitory effect of plant extracts [J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1466
- [2] Iwasaki M, Tsugane S. Dietary heterocyclic aromatic amine intake and cancer risk: epidemiological evidence from Japanese studies [J]. *Genes and Environment*, 2021, 43(1): 1-10
- [3] Bouvard V, Loomis D, Guyton K Z, et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat [J]. *The Lancet Oncology*, 2015, 16(16): 1599-1600
- [4] Marchand L L. The role of heterocyclic aromatic amines in colorectal cancer: the evidence from epidemiologic studies [J]. *Genes and Environment*, 2021, 43(1): 20
- [5] Punnen S, Hardin J, CHENG I, et al. Impact of meat consumption, preparation, and mutagens on aggressive prostate cancer [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e27711
- [6] Suleman R, HUI T, WANG Z, et al. Comparative analysis of charcoal grilling, infrared grilling and superheated steam roasting on the colour, textural quality and heterocyclic aromatic amines of lamb patties [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55(3): 1057-1068
- [7] 张兰, 高天丽, 刘永峰, 等. 八种中式烹饪工艺对牛肉中多环芳烃、反式脂肪酸和亚硝酸盐的影响 [J]. *中国农业大学*, 2017, 50(6): 1126-1138
- [8] Özsaraç N, Kolsarici N, Demirok Soncu E, et al. Formation of heterocyclic aromatic amines in doner kebab cooked with different methods at varying degrees of doneness [J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2019, 36(2): 225-235
- [9] Yao M, Khan I A, Cheng Y, et al. Effects of cooking methods

- and tea marinades on the formation of heterocyclic amines and Benzo[a] pyrene in grilled drumsticks [J]. *Journal of Food Protection*, 2020, 83(2): 365-376
- [10] Bellamri M, WANG Y, Yonemori K, et al. Biomonitoring an albumin adduct of the cooked meat carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in humans [J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(12): 1455-1462
- [11] Alaejos M S, Pino V, Afonso A M. Metabolism and toxicology of heterocyclic aromatic amines when consumed in diet: influence of the genetic susceptibility to develop human cancer. A review [J]. *Food Research International*, 2008, 41(4): 327-340
- [12] PENG L, Turesky R J. Optimizing proteolytic digestion conditions for the analysis of serum albumin adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine, a potential human carcinogen formed in cooked meat [J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 103: 267-278
- [13] PENG L, Turesky R J. Mass spectrometric characterization of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine N-oxidized metabolites bound at Cys34 of human serum albumin [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24(11): 2004-2017
- [14] 彭利娟. 食品致癌物杂环胺的生物标记物的研究进展[J]. *武汉轻工大学学报*, 2016, 35(2): 1-11
- [15] Sabbioni G, Turesky R J. Biomonitoring human albumin adducts: the past, the present, and the future [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2017, 30(1): 332-366
- [16] Bellamri M, Walmsley S J, Turesky R J. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in humans [J]. *Genes and Environment*, 2021, 43(1): 1-32
- [17] Dingley K H, Curtis K D, Nowell S, et al. DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1999, 8(6): 507-512