

超高效液相色谱-大气压化学电离-串联质谱 测定烘焙咖啡中丙烯酰胺

朱铭立^{1*}, 杨黎忠², 张卫锋¹, 蔡成元², 周向东²

(1. 广州市农产品质量安全监督所, 广东 广州 510308; 2. 珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司, 上海 201203)

摘要:建立了烘焙咖啡中丙烯酰胺的超高效液相色谱-大气压化学电离-串联质谱(UHPLC-APCI-MS/MS)分析方法。样品经甲醇提取,HLB固相萃取(SPE)小柱净化,Brownlee validated AQ C18色谱柱分离,采用大气压化学电离(APCI)源,正离子扫描和多反应监测(MRM)模式对丙烯酰胺进行检测,内标法定量。结果表明,丙烯酰胺在0.5~100.0 μg/L范围内具有良好的线性关系,相关系数(r^2)为0.999,方法检出限为5.0 μg/kg,定量限为10.0 μg/kg。在100.0、200.0和1000.0 μg/kg添加水平下,丙烯酰胺的回收率为94.6%~115.0%,相对标准偏差(RSD)值为2.8%~3.6%($n=6$)。本方法采用APCI源作为离子化方式,能有效地减少咖啡基质对丙烯酰胺的基质干扰,前处理简单,灵敏度高,适用于咖啡中丙烯酰胺的日常检测。

关键词:超高效液相色谱-大气压化学电离串联质谱;丙烯酰胺;咖啡

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2019)02-0189-05

Determination of acrylamide in coffee by ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry

ZHU Mingli^{1*}, YANG Lizhong², ZHANG Weifeng¹, CAI Chengyuan², ZHOU Xiangdong²

(1. Guangzhou Agricultural Products Quantity and Safety Supervisory Institute, Guangzhou 510308, China;

2. PerkinElmer Management (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 201203, China)

Abstract: A method using ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-APCI-MS/MS) was developed for the determination of acrylamide in coffee. The coffee samples spiked with ¹³C₃-acrylamide as the internal standard were extracted with methanol, and cleaned using HLB solid phase extraction (SPE) cartridges. The liquid chromatography separation was performed on a Brownlee validated AQ C18 column with isocratic elution. Methanol and 0.1% (volume percentage) formic acid aqueous solution were used as the mobile phase. Identification of acrylamide was achieved by APCI-MS/MS with multiple reaction monitoring (MRM) in the positive mode. The quantification analysis was performed by the internal standard method. The calibration curve showed good linearity with a correlation coefficient of 0.999 in the range of 0.5–100.0 μg/L. The limit of detection (LOD) was 5.0 μg/kg. The limit of quantification (LOQ) was 10.0 μg/kg. Recovery of acrylamide from coffee sample was evaluated at concentrations of 100.0, 200.0 and 1000.0 μg/kg. The average recoveries of acrylamide were between 94.6%–115.0% with relative standard derivations (RSDs) in the range of 2.8%–3.6% ($n=6$). This simple, accurate and sensitive method was proven to be suitable for the determination of acrylamide in coffee.

Key words: ultra performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (UHPLC-APCI-MS/MS); acrylamide; coffee

丙烯酰胺是一种白色晶体化学物质,其分子式为 $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$,易溶于水、乙醇、醚及三氯甲烷等^[1]。丙烯酰胺属于 2A 类致癌物,已有大量的动物模型实验表明,丙烯酰胺具有神经、生殖生育和遗传毒性^[2]。2002 年瑞典科学家^[3]首次发现经高温加热的含淀粉食物会产生丙烯酰胺,进一步研究表明,丙烯酰胺为食品加工过程中发生“美拉德反应”时的副产物。2017 年 11 月 20 日,欧盟^[4]发布指令 EU 2017/2158(已于 2018 年 4 月 11 日实施),制定了食品中的丙烯酰胺的基准水平和缓解措施,以减少食品中的丙烯酰胺的含量。在该指令中,规定了丙烯酰胺的基准水平:焙烤咖啡为 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$;速溶咖啡为 850 $\mu\text{g}/\text{kg}$;咖啡替代产品为 500 ~ 4 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前,食品中丙烯酰胺的分析方法主要有气相色谱(GC)法^[5]、高效液相色谱(HPLC)法^[6,7]、气相色谱-质谱(GC-MS)法^[8-10]和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法^[11-16]等。前两种方法受杂质干扰大,灵敏度低,特异性差。而 GC-MS 法前处理需衍生化反应,操作步骤繁琐,且耗时长,无法满足大批量样品的分析^[8-10]。LC-MS/MS 无需衍生化处理,操作简便,且灵敏度高,近年来被广泛应用于丙烯酰胺的检测^[11-16]。

在食品安全检测方法中常用的大气压质谱离子源有电喷雾离子化技术和大气压化学电离技术。由于两者离子化的方式不同,相对大气压化学电离(APCI)技术而言,电喷雾离子化(ESI)技术的基质效应影响更为显著,导致方法的灵敏度降低,影响实验方法的准确性^[17,18]。目前 LC-MS/MS 法主要采用电喷雾离子化(ESI)技术对丙烯酰胺进行测定^[11-16],鲜少有大气压化学电离技术应用于丙烯酰胺的测定。国内针对食品中丙烯酰胺的检测方法为 GB 5009.204-2014,该方法适用于热加工(如煎、炙烤、焙烤等)食品中丙烯酰胺的测定,规定了液相色谱-大气压电喷雾-串联质谱法和气相色谱-质谱法用于测定食品中丙烯酰胺。该方法在前处理提取过程中采用水作为提取剂,而对于咖啡类样品,水与咖啡粉末形成悬浊液体,难于通过离心获得上清液,严重影响净化步骤的进行。其次烘焙咖啡的基质非常复杂,采用电喷雾离子化技术测定丙烯酰胺存在严重的基质效应,很难对丙烯酰胺进行准确的定性定量检测。

本文采用甲醇作为提取剂,避免了悬浊液的生产,

然后通过 HLB SPE 小柱净化,采用超高效液相色谱-大气压化学电离源-串联质谱(UHPLC-APCI-MS/MS)法进行测定,同位素内标法定量,有效降低了基质干扰,操作步骤简单,为咖啡类产品中丙烯酰胺的检测提供了更为简便高效的方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

QSight220 超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(美国 PerkinElmer 公司),BP211D 感量为 0.01 mg 的电子天平(德国 Sartorius 公司),N-EVAP 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司),SI-T256 旋涡混合器(美国 Scientific Industries 公司),Visiprep24TMDL 固相萃取仪(美国 Supelco 公司),Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司),HLB SPE 小柱(30 mg/1 mL,美国 Waters 公司)。

丙烯酰胺标准品(纯度 $\geq 99\%$)、 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准品(纯度 $\geq 98\%$)、甲酸(色谱纯)、甲醇(色谱纯)和乙酸铵(色谱纯)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;实验用水由 Milli-Q 超纯水机系统制得。实验样品购自当地超市。

1.2 溶液配制

分别准确称取适量丙烯酰胺和 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准品,用超纯水溶解并定容,配成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液,于 3 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;移取适量标准储备液,根据实验需要用水逐级稀释,并配制适当浓度的标准工作液,现用现配。

1.3 样品前处理

准确称取 0.50 g 混匀的试样,置于 10 mL 具塞塑料离心管中,加入 25 μL 2 mg/L $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺同位素内标工作溶液,涡旋静置 2 min,再加入 5 mL 甲醇,涡旋混匀 10 min,以 10 000 r/min 的速度离心 5 min。取 2 mL 上清液过 0.22 μm 有机相微孔过滤头至干净的试管中,准确移取 1 mL 上述滤液于试管中(带准确刻度的试管),加入约 200 μL 超纯水,置于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至约 0.1 mL,用超纯水准确定容至 1 mL,待净化。

采用 2 mL 甲醇和 2 mL 水活化 HLB SPE 小柱,将上述待净化液转移至 HLB SPE 小柱中,使其自然下滴进行样品净化,弃去前 0.5 mL 过柱的净化液(避免活化柱子里剩余的水,导致样品被稀释),收集 0.5 mL 后段的净化液,过 0.22 μm 有机相滤膜,供 LC-MS/MS 测定。

1.4 LC-MS/MS 条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱:Perkinelmer Brownlee validated AQ C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm);柱温:30 ℃;进样量:10 μL;流动相:A相为含0.1%(体积分数)甲酸的5 mmol/L 乙酸铵水溶液,B相为甲醇;流速:0.4 mL/min;等度洗脱:A:B=90:10;分析时间为2 min。

1.4.2 质谱条件

质谱离子源:APCI 电离源;扫描方式:正离子扫描;监测模式:多反应监测(MRM);APCI 源电晕针电流:3 μA;反吹干燥气流速:5 L/min;雾化气流速:7.5 L/min;离子源温度:200 ℃;热表面诱导去溶剂(HSID)质谱接口温度:200 ℃。其他质谱参数见表1。

表1 MRM 扫描模式下丙烯酰胺和¹³C₃-丙烯酰胺的质谱参数

Table 1 MS parameters of acrylamide and ¹³C₃-acrylamide in MRM scan mode

Compound	RT/ min	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	EV/ V	CE/ eV
Acrylamide	1.10	72.0	55.1*	10	-16
	1.10	72.0	44.1	10	-40
	1.10	72.0	27.3	10	-30
¹³ C ₃ -Acrylamide	1.11	75.0	58.1	10	-16

* Quantitative ion; RT: retention time; Q₁: precursor ion;

Q₃: product ion; EV: entrance voltage; CE: collision energy.

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

丙烯酰胺为强极性化合物,在水中的溶解度为204 g/100 mL(25 ℃),而在甲醇中溶解度为155 g/100 mL^[19]。本文选择了水、甲醇作为提取溶剂进行比较,采用水提取的溶液颜色明显深于采用甲醇提取的溶液。而且水与咖啡粉末形成悬浊液,难于通过离心获得上清液,严重影响净化步骤的进行。分别对所得提取液进行了净化后上机试验,结果表明,采用水提取时,在目标化合物峰附近存在杂质峰,无法与目标化合物分离,严重干扰后面的色谱-质谱检测。而甲醇提取溶液无明显杂质干扰,因此最终选择了甲醇作为提取溶剂。

2.2 净化条件的优化

烘焙咖啡制品的基质较为复杂,含有色素、脂肪、蛋白质以及糖类等化合物,导致在使用液相色谱-质谱分析时,存在严重的干扰,需对提取液进行净化处理。为了能够达到净化样品、改善检测效果

的目的,美国食品药品监督管理局(FDA)^[14]发布的采用HPLC-MS/MS检测咖啡中的丙烯酰胺方法和GB 5009.204-2014均使用Oasis HLB和Bond Elut-Accucat固相萃取柱联用法对样品进行净化,但是联用两种固相萃取柱成本较高,并易使回收率降低。本研究采用HLB SPE小柱对提取样品进行净化处理,SPE小柱经甲醇和水活化后,将待净化液转移至HLB SPE小柱,使其自然下滴。因活化HLB SPE小柱时,残余水分残留在HLB SPE小柱内,为避免样品净化液被残余水分稀释,弃去前段0.5 mL净化液,收集后段净化液。采用HLB SPE柱净化,可去除脂肪和蛋白质等杂质,防止色谱柱受到污染,确保实验长期的稳定性。

2.3 质谱条件的优化

丙烯酰胺通常采用电喷雾离子源(ESI)进行检测分析^[11-16],但在预实验中发现,咖啡样品基质在电喷雾离子源下检测丙烯酰胺,产生严重的基质效应,对实验结果带来很大影响。在液相色谱-质谱联用系统中,常见的大气压电离源有ESI源和APCI源。因离子化机理不同,较ESI源而言,APCI源的基质效应影响相对较小些^[17,18]。本文采用1 μg/L丙烯酰胺标准溶液和实际样品提取液(¹³C₃-丙烯酰胺质量浓度均为10 μg/L)在ESI和APCI两种电离模式下进行比较,以¹³C₃-丙烯酰胺的峰面积响应值作为判断依据。如图1所示,在标准溶液中,ESI模式的灵敏度要优于APCI模式;在实际样品中,ESI模式下存在严重的基质干扰,其灵敏度明显低于APCI模式。从表2中可知,在ESI离子源下,实际样品的基质效应为-99%,存在严重的基质效应,从而导致目标化合物响应值降低。而在APCI离子源下,样品的基质效应为-20%,有较小的基质效应,目标化合物获得良好的响应。因此相对ESI源而言,APCI源能大大降低咖啡的复杂基质带来的严重基质效应问题,在实际样品检测中,灵敏度要优于ESI模式,更适合于咖啡中丙烯酰胺的检测分析,因此最终选择APCI模式用于咖啡中丙烯酰胺的测定。

2.4 线性范围和检出限

取丙烯酰胺质量浓度为0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0和100.0 μg/L的系列标准溶液(同位素内标¹³C₃-丙烯酰胺质量浓度为10 μg/L)进行测定,以丙烯酰胺与同位素内标色谱峰峰面积比值为纵坐标y,以系列标准溶液的质量浓度(μg/L)为横坐标x,绘制丙烯酰胺的标准曲线,其线性方程为y =

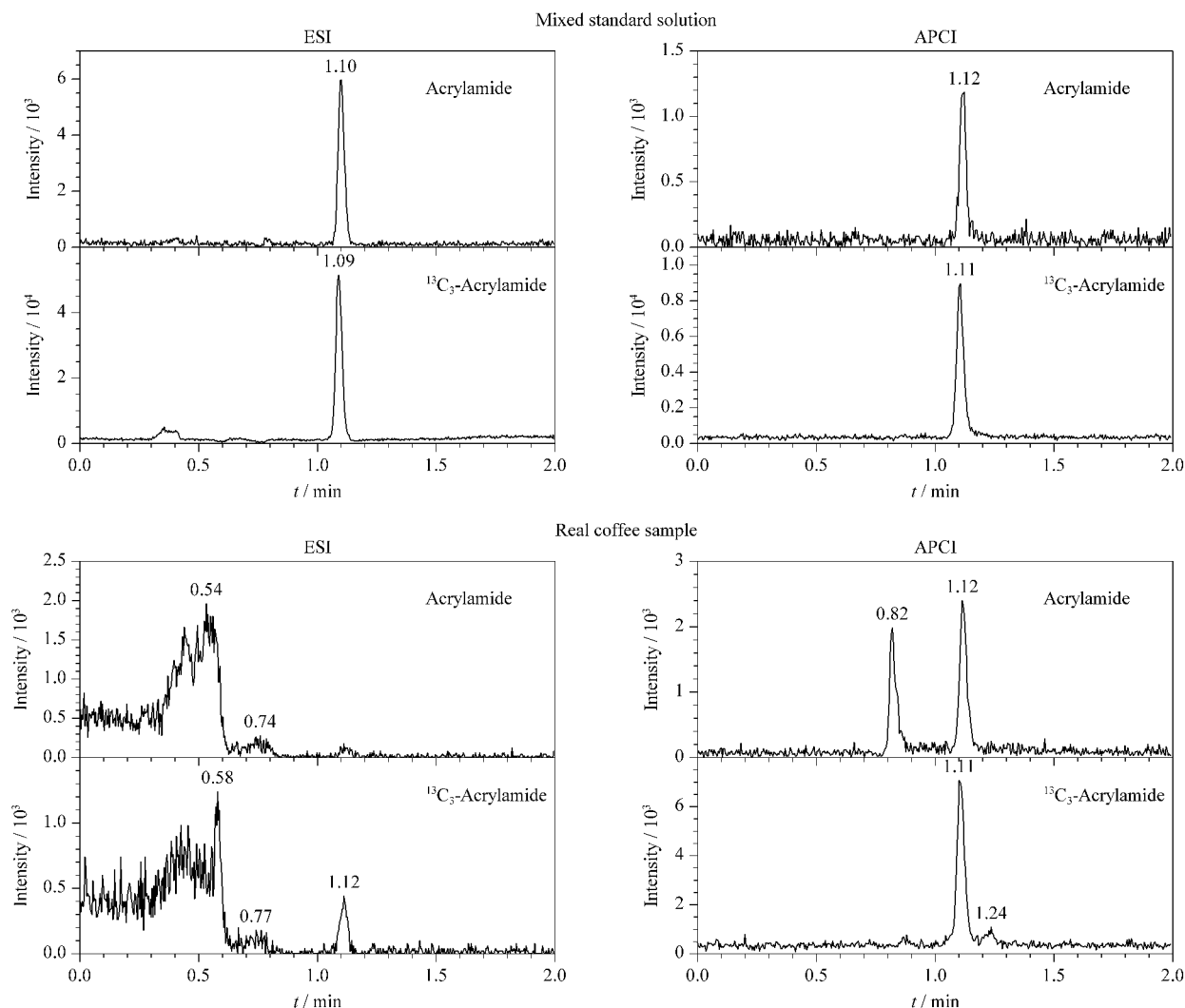


图 1 在 ESI 源和 APCI 源下标准溶液和实际咖啡样品中丙烯酰胺及¹³C₃-丙烯酰胺的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of acrylamide and ¹³C₃-acrylamide in standard solution and real coffee samples in ESI and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) modes

0.116 2x+0.012 89。在 0.5 ~ 100 μg/L 范围内,丙烯酰胺的质量浓度与对应的峰面积比值呈现良好的线性关系,相关系数 r²为 0.999。采用低浓度丙烯

酰胺标准溶液,以超纯水逐级稀释并测定,分别以 3 倍和 10 倍信噪比在扣除基质效应的情况下确定方法的检出限和定量限,本方法的检出限为 5 μg/kg,定量限为 10 μg/kg。该方法检测丙烯酰胺的线性范围宽,灵敏度高,满足咖啡类样品中丙烯酰胺的日常的分析要求。

2.5 回收率和精密度试验

取咖啡样品,按照上述方法处理并测定,得到实际样品中丙烯酰胺的含量为 25.5 μg/kg。在上述样品中添加丙烯酰胺标准溶液,3 个加标水平为 100、200 和 1 000 μg/kg,每个水平各添加 6 份样品,并对样品进行测定。如表 3 所示,丙烯酰胺的平均回收率为 94.6% ~ 115.0%,相对标准偏差 (RSD) 为 2.8% ~ 3.6%。该方法可获得较满意的回收率和

表 2 在 ESI 和 APCI 源下丙烯酰胺和¹³C₃-丙烯酰胺在实际咖啡样品中的基质效应

Table 2 Matrix effects (ME) of acrylamide and ¹³C₃-acrylamide in real coffee samples in ESI and APCI modes

Ion source mode	Sample type	Peak area of acrylamide	Peak area of ¹³ C ₃ -acrylamide	ME/%
ESI	standard solution	11155	96972	
	real coffee sample	221	896	-99
APCI	standard solution	2635	19331	
	real coffee sample	4652	15353	-20

ME: calculation of peak area response ratio of ¹³C₃-acrylamide in real coffee sample and standard solution.

表 3 丙烯酰胺在咖啡样品中的加标回收率及精密度 ($n=6$)
Table 3 Spiked recoveries of acrylamide in coffee samples ($n=6$)

Sample	Background/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Found/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/ %	RSD/ %
Coffee	25.5	100	140.5	115.0	3.5
		200	230.9	102.7	2.8
		1000	971.3	94.6	3.6

精密度。

2.6 实际样品测定

采用本方法对市售 12 批次烘焙咖啡豆中丙烯酰胺的含量进行了分析。结果显示,烘焙咖啡豆中均检出丙烯酰胺,其含量均低于 $400 \mu\text{g}/\text{kg}$, 满足欧盟发布的 EU 2017/2158 指令中规定烘焙咖啡豆中的丙烯酰胺的基准水平。

3 结论

本文建立了 UHPLC-APCI-MS/MS 测定食品中丙烯酰胺含量的方法。对比 GB 5009.204-2014, 本方法用甲醇提取, 无需正己烷脱脂和 HLB 及 Bond Elut-Accucat 两根固相萃取小柱净化, 简化了前处理步骤, 降低了检测成本, 同时利用 APCI 源测定咖啡类样品中丙烯酰胺的含量, 可大大降低咖啡的复杂基质带来的严重基质效应问题。本方法灵敏度高, 回收率良好, 重现性优异, 完全满足咖啡中丙烯酰胺的日常检测要求。

参考文献:

- [1] Zhang L J, Yang L Q, Wang P P, et al. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(8): 274
张璐佳, 杨柳青, 王鹏璞, 等. 中国食品学报, 2018, 18(8): 274
- [2] Li N, Xu L J, Li Q M, et al. Food Research And Development, 2018, 39(9): 213
李娜, 许翎婕, 李清明, 等. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 213
- [3] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. J Agric Food Chem, 2002, 50(17): 4998
- [4] EU 2017/2158

- [5] Lian X S. Straits Science, 2014, 91(7): 61
林现水. 海峡科学, 2014, 91(7): 61
- [6] Zhong W K, Chen D D, Yong W, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2005, 23(3): 312
仲维科, 陈冬东, 雍炜, 等. 色谱, 2005, 23(3): 312
- [7] Zhang W F, Deng Z F, Zhao W J, et al. J Agric Food Chem, 2014, 62(26): 6100
- [8] Cagliero C, Ho T D, Zhang C, et al. J Chromatogr A, 2016, 1449: 2
- [9] Shen W J, Shen C Y, Zhao Z Y, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2006, 24(6): 625
沈伟健, 沈崇钰, 赵增运, 等. 色谱, 2006, 24(6): 625
- [10] Yang S C, Zhang H, Wang J H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(5): 404
杨斯超, 张慧, 汪俊涵, 等. 色谱, 2011, 29(5): 404
- [11] Wang C L, Zhao J L, Li Y Y, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(12): 1294
王成龙, 赵金利, 李燕莹, 等. 色谱, 2017, 35(12): 1294
- [12] Yang W H, Huang Y H, Chen Y K, et al. Food Research and Development, 2015, 36(24): 134
杨旺火, 黄永辉, 陈言凯, 等. 食品研究与开发, 2015, 36(24): 134
- [13] Yin Y P, Bian H W, Li B, et al. Food Science and Technology, 2017, 42(5): 284
阴永波, 卞华伟, 李冰, 等. 食品科技, 2017, 42(5): 284
- [14] Cheng L, Zheng Y X, Xu H, et al. Journal of Food Science, 2012, 33(2): 231
程雷, 郑炎夏, 徐虹, 等. 食品科学, 2012, 33(2): 231
- [15] Wang H, Zhao L, Yu X J, et al. Food Research and Development, 2018, 39(14): 168
王浩, 赵丽, 于晓瑾, 等. 食品研究与开发, 2018, 39(14): 168
- [16] Qin D L, Luo Y P, Tian Y, et al. Environmental Monitoring in China, 2014, 30(6): 142
秦迪岚, 罗岳平, 田耘, 等. 中国环境监测, 2014, 30(6): 142
- [17] Xie J S, Ge Q H. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2008, 28(8): 1386
谢家树, 葛庆华. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 1386
- [18] Jia Y B, Wang Q Q, Song H F. Military Medical Sciences, 2011, 35(2): 151
贾彦波, 王清清, 宋海峰. 军事医学, 2011, 35(2): 151
- [19] Acrylamide Sigma Prod. No. A8887: A8887-Product Information Sheet. [2018-10-16]. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a8887pis.pdf