

超高效液相色谱-串联质谱法测定面粉中的偶氮甲酰胺

吴正双, 梁焯琼, 钟海娟, 王建伟

(佛山市质量计量监督检测中心, 广东佛山 528225)

摘要: 本文建立了面粉中偶氮甲酰胺(ADA)的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。面粉样品中的ADA经湿热处理后, 最终转变成氨基脲(SEM), 加入2-硝基苯甲醛37℃过夜衍生化, 乙酸乙酯提取后, 电喷雾正离子扫描, 多反应监测(MRM)模式检测, 外标法定量, 通过测定SEM的量来间接计算ADA含量。该方法的ADA检测限为0.21 mg/kg, 远远低于HPLC法的1 mg/kg; 线性范围为1~100 mg/kg, 相关系数 $r=0.9997$, 回收率为86.8~117.2%, 相对标准偏差(RSD)<6%。该方法方便、灵敏度高、定性定量准确, 可实现对面粉中偶氮甲酰胺的检测。

关键词: 面粉; 偶氮甲酰胺; 氨基脲

文章编号: 1673-9078(2012)9-1239-1242

Determination of Azodicarbonamide in Flour by UPLC-MS/MS

WU Zheng-shuang, LIANG Chi-qiong, ZHONG Hai-juan, WANG Jian-wei

(Foshan Supervision Testing Centre of Quality and Metrology, Foshan 528225, China)

Abstract: A quantitative assay for the determination of azodicarbonamide(ADA) using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS) was developed. ADA in flour was hydrolyzed with wet heat processing and formed semicarbazide(SEM) finally. SEM was derivatized overnight with 2-nitrobenzaldehyde at 37℃. The derivative was extracted with ethyl acetate, and MS detection was performed with the positive ion mode in multi-reaction monitoring(MRM). Determination of ADA was according to the amount of SEM which was determined as external method. Compared with the method of HPLC, the limit of detection was 0.21 mg/kg for ADA, which was lower than 1mg/kg for HPLC. Within the linear range of 1~100 mg/kg, correlation coefficient was 0.9997. The recovery rate were 86.8~117.2% (RSD <8%). The method developed was convenient, accuracy, and sensitivity to be used effectively for determining ADA in flour.

Key words: flour; azodicarbonamide; semicarbazide

偶氮甲酰胺(Azodicarbonamide, ADA)是一种黄至橘红色结晶性粉末, 具有漂白和氧化双重作用, 是常用的面粉处理剂。ADA自身与面粉不起作用, 当将其添加于面粉中加水搅拌成面团时, 能快速释放出活性氧, 此时面粉蛋白质中氨基酸的巯基(-SH)被氧化成二硫键(-S-S), 使蛋白质链相互连结而构成立体网状结构, 改善面团的弹性、韧性、均匀性, 显著增强面团筋力^[1]。偶氮甲酰胺作为一种面粉漂白剂和改良剂, 在美国、加拿大、亚洲等国家已被广泛应用^[2,3]。目前, 我国GB2760-2011《食品添加剂使用卫生标准》规定小麦粉中ADA最大使用量为45 mg/kg^[4], 但澳大利亚和欧盟禁止在面粉中添加ADA, 新加坡更是对面粉中添加ADA的行为处以15年监禁和45万美元的严厉处罚^[5]。

近年来, 研究表明ADA在湿润的条件下能够迅速转变成联二脲(Biurea), 联二脲在高温条件下又能够转变成氨基脲(Semicarbazide, SEM)^[6,7], 反应过程如图1所示。SEM是一种与硝基咪唑类药物-咪唑西林代谢产物一致的化合物, 具有致突变和致癌作用, 常作为咪唑西林的代谢物在兽药残留中被检出。同时有文献显示, 添加了ADA的面粉加水揉搓成面团时, 有联二脲产生, 面团再在蒸、烤等高温处理后, 检出有SEM, 并指出面制品中的SEM来源于面粉中添加的ADA^[8,9]。因此, 面粉中偶氮甲酰胺的快速检测方法的开发显得尤为重要。

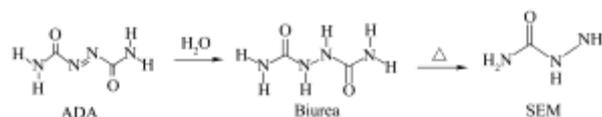


图1 偶氮甲酰胺形成氨基脲的反应机制

Fig.1 Mechanism of formation between ADA and SEM

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2012-07-27

基金项目: 广东省质量技术监督局科技项目(2010ZBD2)

作者简介: 吴正双(1985-), 男, 硕士, 主要从事食品风险检测的工作

通讯作者: 梁焯琼(1973-), 女, 硕士, 高级工程师, 主要从事食品检测工作

面粉, 由佛山一家小麦粉生产企业提供。

偶氮甲酰胺(Azodicarbonamide, ADA): 先由二甲基亚砷溶解, 再用甲醇稀释到所需浓度; 2-硝基苯甲醛(2-nitrobenzaldehyde, 2-NBA); 氨基脒(Semicarbazide, SEM), 纯度均大于99.0%, Sigma公司。

乙腈、甲醇、甲酸, 均为色谱纯。

二甲基亚砷、乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钾均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Quattro Premier XE超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(UPLC-MS/MS), 美国Waters公司; OA-SYS水浴氮吹仪, 美国Organomation公司; 电子天平; 漩涡式混合器; 恒温振荡器; 离心机。

1.3 实验方法

1.3.1 样品溶液的制备

称取面粉试样1 g置于50 mL离心管, 加入10 mL 0.2 mol/L的盐酸溶液, 于漩涡振荡器上混匀。将样品在水浴条件下放置一定的时间, 中间不时振荡混匀; 取出样品, 冷却至室温, 加入0.1 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液, 漩涡混合1 min, 置于37 °C恒温水浴振荡器上振荡过夜(16 h)反应。取出离心管放置至室温后, 加入1 mL的0.3 mol/L K₂HPO₄溶液, 用4 mol/L KOH溶液调节pH 7.4(±0.2), 加入10 mL乙酸乙酯, 轻轻颠倒混匀, 振荡器上提取30 min, 4500 r/min离心5 min, 吸取上清液。用10 mL乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 于50 °C下氮气吹干, 残渣用1.0 mL甲醇溶解, 漩涡1 min, 过0.22 μm滤膜, 滤液供超高效液相色谱串联质谱联用仪测定。

1.3.2 基质标准溶液的制备

称取约1 g的阴性面粉试样于50 mL离心管中, 加入10 mL 0.2 mol/L的盐酸溶液, 漩涡混匀后, 加入ADA标准溶液, 使基质溶液中ADA的质量分别为1、5、20、50、100 μg, 余下操作同1.3.1。

1.3.3 UPLC-MS/MS 检测条件

(1) UPLC条件: 色谱柱: Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm, 100×2.1 mm; 柱温: 35 °C; 进样体积: 5 μL; 流动相: A为0.1%的甲酸-水溶液, B为乙腈; 流速: 0.2 mL/min, 梯度洗脱, 洗脱程序见表1。

表1 UPLC梯度洗脱程序

Table 1 UPLC program of gradient elute

时间/min	A (0.1% 甲酸-水溶液)	B (乙腈)	流速(mL/min)
0.00	90	10	0.2
7.00	10	90	0.2
7.01	90	10	0.2
8.00	90	10	0.2

(2) 质谱条件: 电离方式: 电喷雾正离子(ESI+)模式; 毛细管电压: 3.5 kV; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂温度: 350 °C; 脱溶剂气流: N₂, 流速500 L/h; 锥孔气流: N₂, 流速50 L/h; 碰撞气: 氩气, 流速0.12 mL/min; 扫描方式: 多反应监测(MRM); 监测离子对: 定性离子为m/z 209>191.85, 定量离子为m/z 209>166。

2 结果与分析

2.1 方法原理

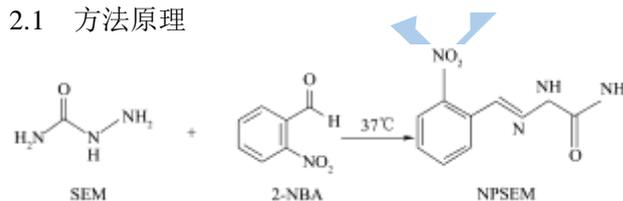
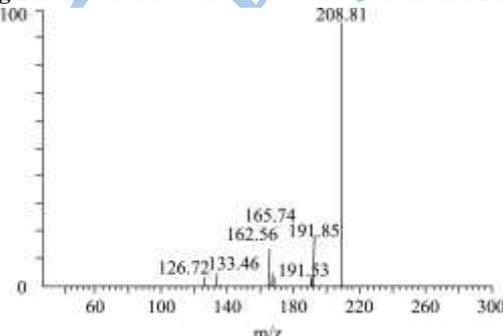
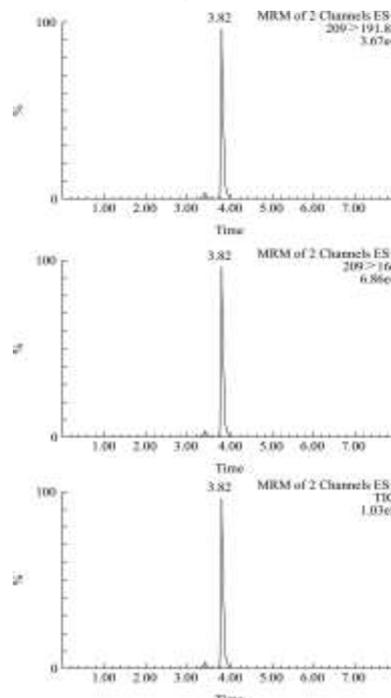


图2 SEM与NBA的衍生反应

Fig.2 Derivation reaction between SEM and 2-NBA



a ADA终产物的质谱图



b ADA终产物的离子色谱图

图3 ADA终产物的质谱图和离子色谱图

Fig.3 Spectrum and total ion chromatography of end-product of ADA

面粉中的ADA经过湿热处理后, 最终生成SEM, SEM在紫外光区几乎无吸收, 同时SEM分子量较小, 仅为75, 在ESI+模式下基质干扰严重, 灵敏度低^[7]。但SEM上的R-NH₂在酸性条件下能与2-NBA的羰基迅速发生反应(见图2), 生成比较稳定的衍生物, 该衍生物离子化效率高, 能够大大提高质谱检测灵敏度, 故本实验通过测定该衍生物来计算面粉中的ADA含量^[10]。SEM衍生物的质谱图、总离子流图、定性离子、定量离子色谱图见图3。

2.2 反应条件对ADA测定结果的影响

由于面粉中的ADA要经过水解、高温以及2-NBA衍生化处理, 才能经UPLC-MS/MS检测, 所以本实验以温度、加热时间、0.1 mol/L的2-NBA用量为影响因素, 以ADA终产物的定量离子峰(m/z 209>166)的峰面积为指标, 研究了反应条件对ADA测定结果的影响。

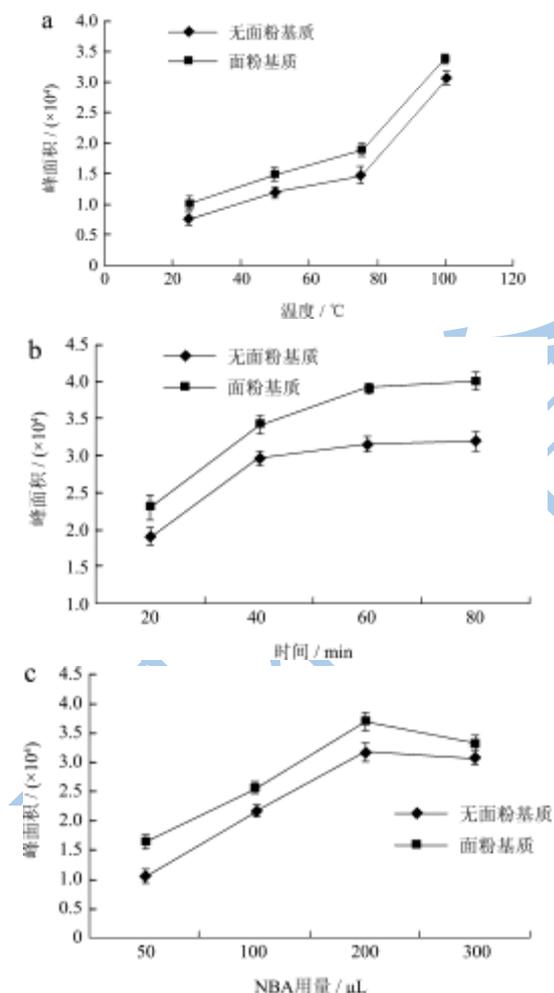


图4 温度(a)、时间(b)和2-NBA用量(c)对定量离子峰面积的影响
Fig.4 Effects of time(a), temperature(b) and amount of 2-NBA(c) on area of quantification ion

结果表明, ADA终产物的定量离子m/z 209>166峰面积随着温度的升高而增大, 在100 °C时达到最大, 与其他温度均存在显著性差异(P<0.05)。因为面粉中主要

成分是淀粉, 淀粉糊化温度为53~70 °C度不等, 所以在50和75 °C时, 糊化现象使面粉粘度增加, 当加入乙酸酯后很容易出现破乳现象, 使有机层难于分离, 影响提取效果; 但在100 °C时, 淀粉粒会被破坏, 粘度大大降低, 有利于乙酸酯的提取^[11,12], 如图4a所示。

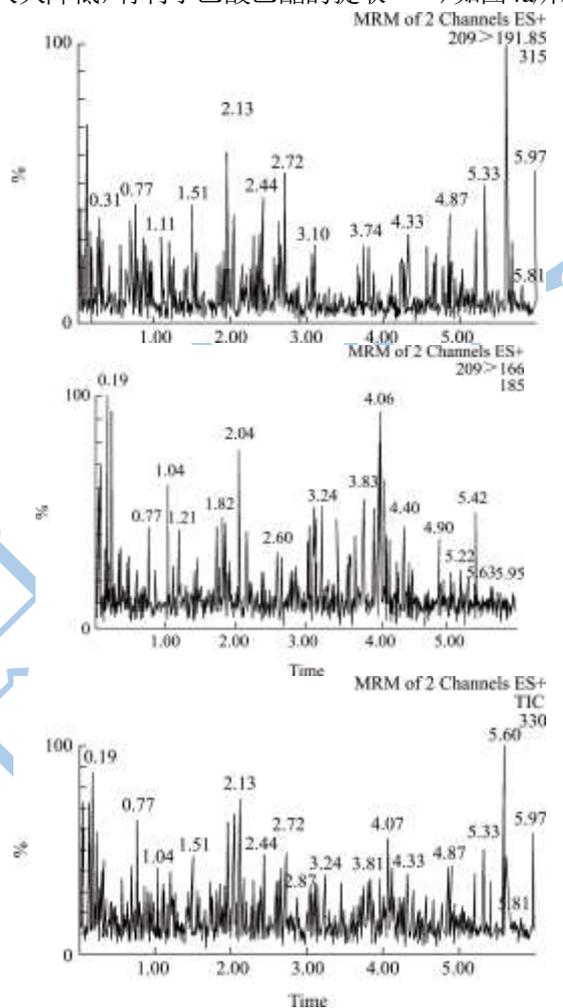


图5 空白面粉离子色谱图

Fig.5 Total ion chromatography of blank flour

含ADA的面粉在100 °C下处理, 定量离子峰面积随着加热时间的延长而增加, 但加热60 min与80 min并没有明显增加(P>0.05), 所以加热时间以60 min为宜, 如图4b所示; 当加入0.1 mol/L的2-NBA溶液用量在50~200 μL时, 体积每增加一倍, 定量峰面积也增加一倍, 说明衍生反应中可能存在竞争性反应^[9], 当用量为200 μL时, 峰面积达到最大值, 再增大其用量, 峰面积反而下降, 说明衍生反应中可能存在底物抑制现象, 故用量以200 μL较好。

故本实验的反应条件确定为100 °C下加热60 min, 加入衍生剂2-NBA的量为200 μL。

另外, 本实验还发现空白面粉经处理后并未检出SEM, 其离子色谱图如图5所示。但1.3.2方法中以空白面粉做为基质时, 定量峰面积明显增加, 说明反应符

合基质匹配效应^[13], 故制作标准曲线时, 标准品ADA也必须以空白面粉为基质, 以提高定量结果的准确性。

2.3 线性范围、加标回收率和检出限

在2.2确定的条件下, 按照1.3.2中的方法处理, 以ADA标准品质量为横坐标, 以其终产物的m/z 166离子峰面积为纵坐标做图, 实验结果表明, 面粉中ADA含量在1~100 mg/kg范围内呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y=91.4358X-51.6485$, 线性系数 $r=0.9997$ 。

表3 ADA加标回收率测定结果

Table 3 Results of recovery of the method for ADA detection

ADA添加水平/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
1	86.8	5.47
5	93.7	5.32
20	105.9	5.88
50	117.2	5.60

以面粉为基质, 分别添加1 mg/kg、5 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg的4个水平的ADA标准品, 每个加标水平平行测定4次。实验结果见表3, 本方法的平均回收率在86.8~117.2%之间, 方法的相对标准偏差小于6%, 完全满足日常检测工作的需要。

根据国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)对检出限的定义, 本实验以空白面粉添加低浓度ADA标准品, 使ADA浓度水平分别为1 mg/kg和0.5 mg/kg, 每个水平按照1.3.1中的方法均平行测定6次, 分别计算出6次测定结果的标准偏差, 以标准偏差的3倍作检出限(置信水平 $P=95%$)^[4], 得到这两种水平的检出限分别为0.24 mg/kg和0.21 mg/kg。然后, 按照1.3.1中的方法验证, 结果显示, ADA浓度为0.21 mg/kg的面粉在UPLC-MS/MS仍然有响应, 且信噪比 $S/N>3$, 故确定本方法的检测限为0.21 mg/kg, 远远低于其他文献中HPLC法的1 mg/kg的检出限^[4,16]。

3 结论

3.1 本实验发现面粉中的偶氮甲酰胺经过湿热处理可以转变成氨基脲, 所以可通过测定氨基脲含量来实现对偶氮甲酰胺的定量。

3.2 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法灵敏度高; 可检测的ADA浓度范围大, 在1~100 mg/kg的浓度范围内线性关系良好, $r=0.9997$; 检测限为0.21 mg/kg, 远远低于HPLC法的1 mg/kg; 加标回收率86.8~117.2%, 相对标准偏差小于6%。UPLC-MS/MS方法方便、灵敏度高、定性定量准确, 可实现对面粉中偶氮甲酰胺的检测。

参考文献

- [1] 李晔, 李晓光. 偶氮甲酰胺在高筋面粉中应用研究[J]. 粮食与油脂, 2003, 5: 6-8
- [2] Cereal Flours and Related Products, Code of Federal Regulations, Part 137.105 and 137.200, Title 21, 20
- [3] Becalski A, Lau B P-Y, Lewis D, et al. Semicarbazide in Canadian bakery products [J]. Food Additives and Contaminants, 2006, 23(2): 107-109
- [4] 王茂起, 王竹天, 陈君石, 等. GB-2760-2011 食品安全国家标准食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011
- [5] European Food Safety Authority Document. "Advice of the ad hoc expert group set up to advise the EFSA on the possible occurrence of semicarbazide in packaged foods, 28 July 2003"
- [6] Stadler R H, Mottier P, Guy P, et al. Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars [J]. Analyst 2004, 129(3): 276-281
- [7] Maria Beatriz de la Calle, Anklam E. Semicarbazide: occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(4): 968-977
- [8] Gregory O N, Timothy H B, Diachenko G W. Semicarbazide formation in flour and bread[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(6): 2064-2067
- [9] Becalski A, Lau B P-Y, Lewis D, et al. Semicarbazide formation in azodicarbonamide-treated flour: A model study [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(18): 5730-5734
- [10] McCracken R J, Spence D E, Floyd S D, et al. Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in eggs [J]. Food Additives and Contaminants, 2001, 18(11): 954-959
- [11] 甘淑珍, 付一帆, 赵思明. 小麦淀粉糊化的影响因素及粘度稳定性研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(2): 36-39
- [12] 兰静, 戴常军, 李辉, 等. GB/T 14490-2008 粮油检验谷物及淀粉糊化特性测定粘度仪法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [13] 李克安, 金钦汉, 等译. 分析化学[M]. 北京: 北京大学出版社, 2005
- [14] Inczedy J, Lengyel T, Ure A M. Compendium of Analytical Nomenclature [M]. 3rd edition, IUPAC: Blackwell Scientific Publication, 1998
- [15] 周陶忆, 陆琦, 孙凯峰. 小麦粉中偶氮甲酰胺检测技术研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1412-1414
- [16] 周漪波, 黄芳, 朱志鑫, 等. 小麦粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱法快速测定[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 102-105

现代食品科技