

超高效液相色谱-串联质谱测定 面制品中的呋喃西林代谢物

钟海娟, 梁焯琼, 王建伟, 吴正双

(佛山市质量计量监督检测中心, 广东佛山 528225)

摘要: 利用超高效液相色谱-电喷雾串联质谱 (UPLC-ESI-MS/MS) 方法测定了面制品中的呋喃西林代谢物-氨基脒 (SEM)。样品经 0.2mol/L 的盐酸溶液均质, 2-硝基苯甲醛衍生化, 乙酸乙酯提取浓缩后, 经固相萃取 (SPE) 柱净化, 采用 BEH C₁₈ 柱分离, 以乙腈和 0.1% (V/V) 的甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 采用正离子、多反应监测 (MRM) 模式进行定性定量测定。结果表明弱阳离子交换柱的净化效果较好, 氨基脒在 1~100 μg/kg 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数 r 为 0.9993; 检出限为 0.4 μg/kg。添加水平分别为 2、10、50 μg/kg 时的加标回收率为 85.8%~112.6%, 相对标准偏差小于 9%。本方法适用于不同面制品中氨基脒的定性和定量分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 固相萃取; 氨基脒; 面制品

文章编号: 1673-9078(2013)2-416-421

Determination of Semicarbazide in Flour Products by Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

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

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

Abstract: A method was developed for the determination of semicarbazide in flour products based on solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-MS/MS) in the article. The samples were homogenized with 0.2mol/L HCl, derivatized with 2-nitrobenzaldehyde, and the derivative was extracted with ethyl acetate. The extract was cleaned up by a solid phase extraction cartridge. The target analytes were separated on a UPLC BEH C₁₈ column with gradient elution using acetonitrile and water containing 0.1% (V/V) formic acid as mobile phase. The identification and quantification were achieved by using ESI-MS/MS in positive ion mode and with multiple reactions monitoring (MRM). The linear range was from 1 to 100 μg/kg with the correlation coefficient $r=0.9993$ for semicarbazide. The limit of detection (LOD) was 0.4 μg/kg. The recoveries of the method were ranged from 85.8% to 112.6% at the spiked levels of 2, 10, 50 μg/kg and the relative standard deviation was less than 9%. The method was suitable for the qualitative and quantitative of semicarbazide in different flour products.

Keyword: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid-phase extract; semicarbazide; flour products

氨基脒 (Semicarbazide, SEM) 是呋喃西林 (nitrofurazone) 的稳定代谢产物, 呋喃西林是硝基呋喃类药物的一种, 被用作农场饲养的家禽和水产品中, 对革兰氏阳性菌及阴性菌均有一定抗菌作用^[1]。但由于硝基呋喃类具有一定的致癌性和诱变特性, 欧盟禁止将硝基呋喃类药物用于任何食源性动物, 且规定食品中不得含有硝基呋喃类残留物及其代谢产物^[2]。但

收稿日期: 2012-09-25

课题名称: 广东省质量技术监督局科技项目 (2010ZB02)

作者简介: 钟海娟(1983-), 女, 硕士, 主要从事食品风险检测的工作

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

源性食品也检出有氨基脒。文献显示, 氨基脒的来源目前已在不同的食品中发现了氨基脒, 特别是非动物主要有四种: 一是使用呋喃西林抗生素, 呋喃西林在动物体内代谢产生 SEM^[3]; 二是制造塑料包装材料时, 使用了发泡剂-偶氮甲酰胺 (ADA), ADA 在加热条件下形成 SEM^[4]; 三是在面粉中添加 ADA 作为改良剂, 以提高面团的韧性和吸水性, ADA 在面团加工过程中易形成 SEM^[5-6]; 四是食品或食品添加剂中使用次氯酸盐也会产生微量的 SEM^[7]。

目前, 国内有关硝基呋喃类代谢物的分析检测主要集中在动物源性食品、水产品、饲料和蜂蜜等方面, 对面制品中 SEM 的来源及检测研究还很少。但国外众

多研究表明,许多面制品中也有呋喃西林代谢物-SEM,原因是添加了偶氮甲酰胺的面粉做成面制品后,偶氮甲酰胺能够转变成了氨基脒,且面制品中的氨基脒主要是由添加的偶氮甲酰胺转化而来^[5-6,8-9]。因此,本文在前人研究的基础上,采用固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱方法对不同面制品中的SEM进行检测,方法检出限低至0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,并找出了SEM与偶氮甲酰胺的大致转化率,为实现质检部门对面粉中偶氮甲酰胺的监测具有一定的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

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; 乙腈和甲醇(德国CNW公司)、甲酸(天津科密欧公司)均为色谱纯; 二甲基亚砜、乙酸乙酯、正己烷、盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钾均为分析纯; 0.1 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液: 准确称取0.75 g 2-硝基苯甲醛,用甲醇溶解并定容至50 mL; C_{18} 固相萃取小柱: 60 mg/3 mL, 美国Supelco公司,使用前分别用5 mL甲醇和5 mL水活化,保持柱体湿润; Oasis HLB固相萃取柱(60 mg/3 mL, Waters公司)、Strata-X-CW弱阳离子交换柱(60 mg/3 mL, Phenomenex公司)使用前均分别用5 mL甲醇和5 mL水活化,使用过程中保持柱体湿润; 自制面包: 用已知偶氮甲酰胺含量的面粉烤成的面包; 市售面包、市售挂面、市售面饼、市售馒头等样品购自佛山超市和综合市场。

1.2 仪器与设备

Quattro Premier XE超高效液相色谱-电喷雾串联质谱仪(UPLC-ESI-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; 酸度计。

1.3 实验方法

1.3.1 样品溶液的制备

称取面制品样品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。加入0.1 mol/L的2-硝基苯甲醛溶液200 μL ,漩涡混合1 min,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡器上振荡过夜(16h)反应。取出离心管放置至室温后,加入1 mL的0.3 mol/L K_2HPO_4 溶液,用4 mol/L NaOH溶液调节pH值至7.4(± 0.2),加入10 mL乙酸乙酯,轻轻颠倒混匀,振荡器上提取20 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 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,残渣用10%乙腈水溶液溶解,漩涡1 min,必要时加入3 mL乙腈饱和的正己烷除脂肪,4500 r/min离心5 min,

弃去上层正己烷,下层溶液待净化。

1.3.2 样品净化

取下层备用液过预处理好的Strata-X-CW弱阳离子交换柱,控制流速 ≤ 1 mL/min,依次用3 mL水、3 mL甲醇淋洗,然后用6 mL 5% (v/v)氨水甲醇洗脱,洗脱液在50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下氮气吹干,用甲醇定容至1.0 mL,用漩涡混合器充分混匀,过0.2 μm 微孔滤膜,滤液供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3.3 基质标准溶液的制备

称取约1g的阴性面包样品分别于4支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SEM标准溶液,使基质溶液中SEM的质量分别为10、50、200、500 ng,余下操作同1.3.1和1.3.2。

取阴性样品,按上述方法做基质加标回收率实验。

1.3.4 UPLC条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 100 \times 2.1 mm; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 5 μL ; 流动相: 0.1%的甲酸-水溶液(A)和乙腈(B); 流速: 0.2 mL/min, 梯度洗脱程序: 0~7 min, 90%~10% A, 7~7.01 min, 10%~90% A, 7.01~8 min, 90% A。

1.3.5 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 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流: N_2 , 流速500 L/h; 锥孔气流: N_2 , 流速50 L/h; 碰撞气: 氩气, 流速0.12 mL/min; 监测方式: 多反应监测(MRM)模式; 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 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

本实验在调谐条件下通过注射器直接进样,首先研究了SEM衍生物的母离子质谱,确定质荷比m/z 209为母离子,然后进行子离子扫描,确定定量和定性离子对,对离子源、毛细管电压、脱溶剂气温度和流速、取样锥孔电压、碰撞能、锥孔气流、碰撞气流速等参数进行了优化,优化参数见表1。

表1 SEM衍生物保留时间及串联质谱参数

Table 1 Retention time and MS/MS parameters of SEM derivative

分析物	保留时间(t/min)	母离子/mz	子离子/mz	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	驻留时间/(t/s)
SEM	3.81	209	166*	20	10	0.1
衍生物			191.85	25	10	0.1

注: *代表定量离子

2.2 固相萃取条件的选择

表 2 不同固相萃取柱的净化效果

Table 2 Purification effects of different solid phase extraction columns

固相萃取柱	加标水平(μg/kg)	回收率/%	RSD/%
Supelco C ₁₈	2	59.1	7.2
	10	68.4	6
Oasis HLB	2	54.2	6.8
	10	61.4	8.5
Strata-X-CW	2	85.8	6.1
	10	94.3	5.4

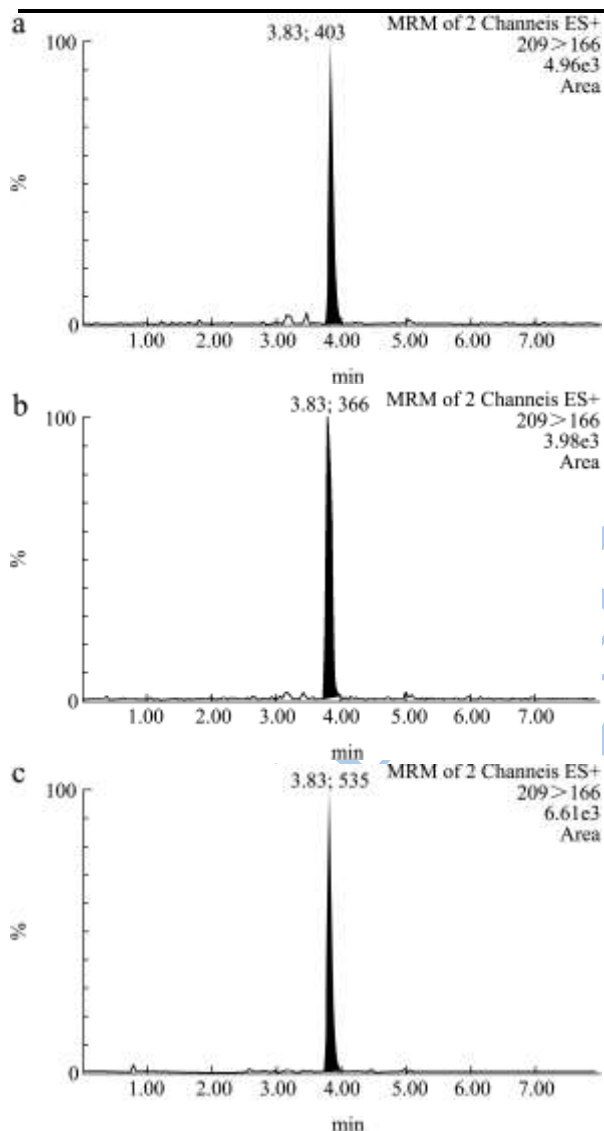


图 1 不同固相萃取柱的净化效果离子色谱图

Fig.1 Ion chromatography of the purified samples of different SPE columns

注: A Supelco C₁₈ 固相萃取柱净化; B Oasis HLB 固相萃取柱净化; C Strata-X-CW 固相萃取柱净化。

SEM 衍生物为亲脂性有机化合物, 易溶于乙酸乙酯, 用传统的液液萃取净化时易产生乳化现象, 特别是对高脂肪、高淀粉的样品, 影响提取效果, 降低结果的准确性。因此, 本研究采用固相萃取法净化样品, 比较了 Supelco C₁₈ 柱、Oasis HLB 柱、Strata-X-CW 弱阳离子交换柱的净化效果, 结果见表 2 和图 1。发现三种填料对 SEM 衍生物均有吸附作用, 而弱阳离子交换柱的净化效果最好, 平均回收率最高, 稳定性好; 而且弱阳离子交换柱具有较强的选择性, 经淋洗后能完全去除非极性物质及大部分的极性物质, 离子色谱图中几乎无杂峰, 见图 1C。Oasis HLB 效果最差, 可能是由于 Oasis HLB 固相萃取柱选择性差, 且未经过淋洗去杂质的过程, 洗脱液中仍含有较多的杂质成分, 未能达到净化的效果, 从离子色谱图中也可以看到有一些小的杂峰, 见图 1B。

2.3 线性范围、检测限

本实验对标准品 SEM 在 1~100 μg/kg 的浓度范围内进行线性分析, 得到线性方程 $Y = 6.634X - 6.040$, $r = 0.9993$ 。在阴性样品中添加目标化合物, 得到方法检测限 LOD(以 $S/N=3$ 计) 为 0.4 μg/kg。

2.4 回收率和精密度

采用标准物质添加回收的方法, 在不含 SEM 的面制品基质中添加标准物质, 每种面制品均设 3 个添加水平, 分别为 2、10、50 μg/kg, 按照 1.3 中的方法处理净化样品、质谱测定并计算回收率和精密度, 结果见表 3, 相对标准偏差均小于 9%, 能够满足日常检测工作的需要。

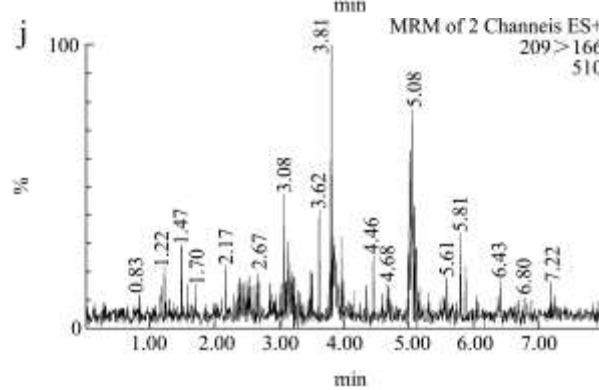
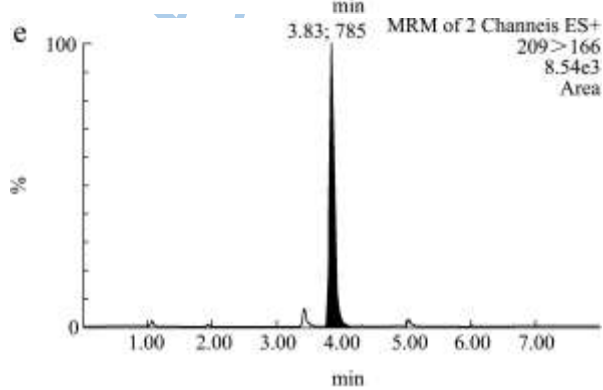
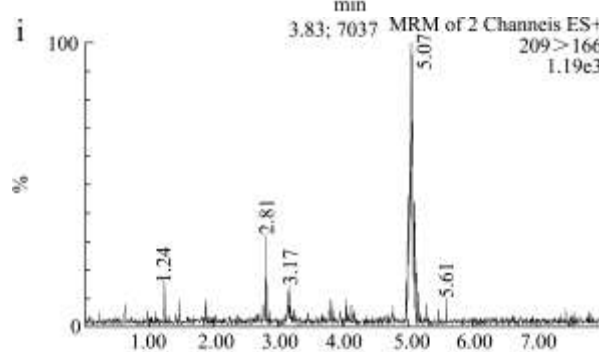
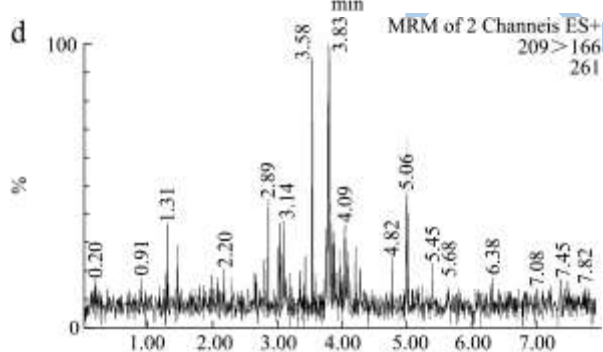
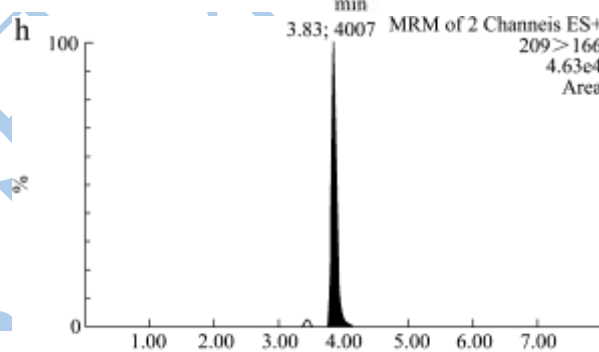
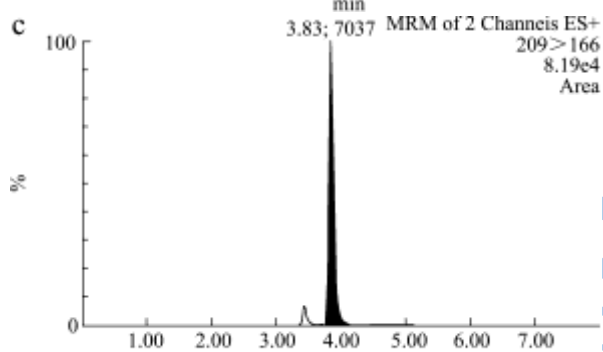
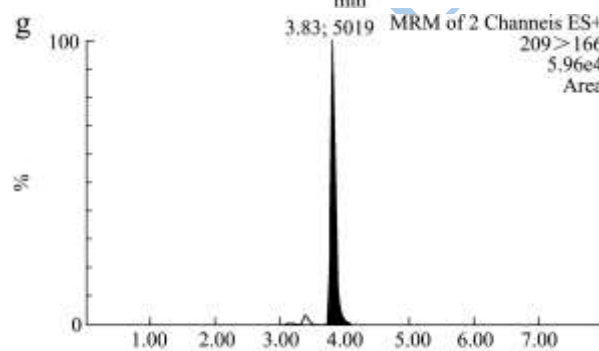
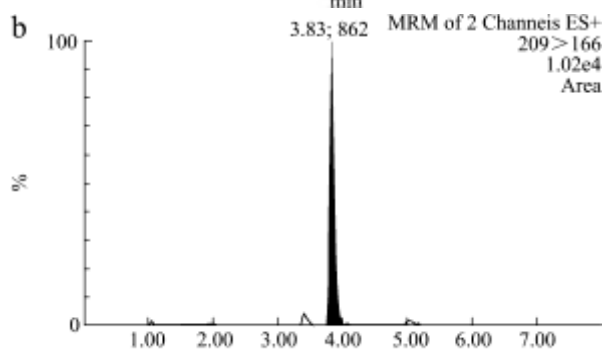
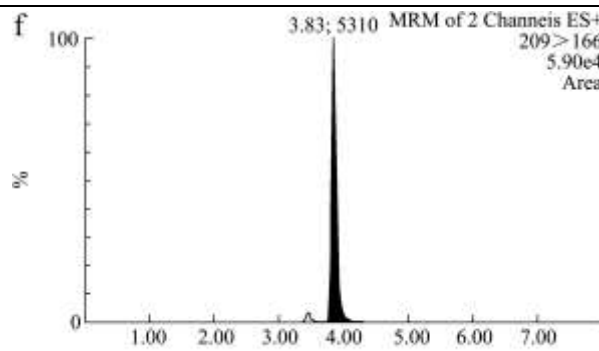
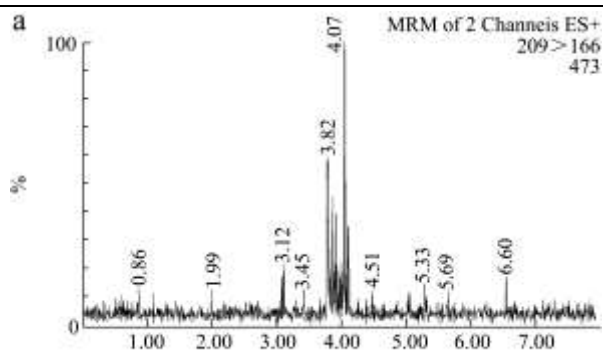
表 3 SEM 加标回收率测定结果

Table 3 Result of recovery of the method for SEM detection

基质	SEM 添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%
面包	2	86.9	7.06
	10	94.8	6.32
	50	108.7	5.48
馒头	2	88.1	6.34
	10	95.3	5.66
	50	112.6	6.12
挂面	2	85.8	8.11
	10	94.9	6.95
	50	103.7	6.02

2.5 不同面制品中 SEM 的检测结果

本研究按照上述确定的方法, 测定了自制面包(所用面粉包括不含 ADA、ADA 含量分别为 10 mg/kg 和 40 mg/kg 三种)、市售面包、市售馒头、市售面饼和挂面中的 SEM 含量, 结果见图 2。



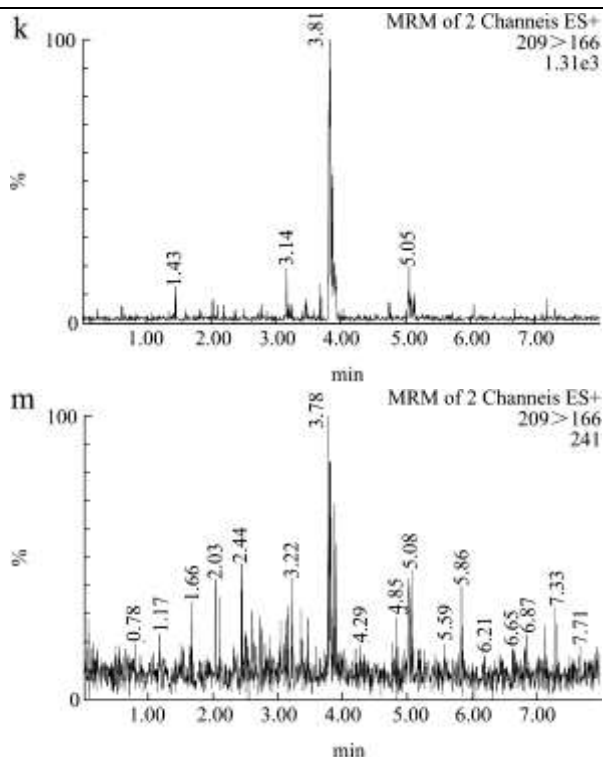


图2 不同面制品中SEM的测定结果

Fig.2 Determination results of SEM in different flour products

注：a.以不含ADA的面粉制成的面包表面；b.含10 mg/kg ADA的面粉制成的面包表面；c.含40mg/kg ADA的面粉制成的面包表面；d.以不含ADA的面粉制成的面包内部；e.含10 mg/kg ADA的面粉制成的面包内部；f.含40 mg/kg ADA的面粉制成的面包内部；g.市售面包外部；h.市售面包内部；i.馒头1；j.馒头2；k.面饼；m.挂面。

由图2可知，不含ADA的面粉制成的面包内部和表面均未检出SEM，但含有ADA的面粉制成的面包中都检出有SEM，说明面包中的SEM来自于面粉中的ADA，且面包表面的SEM含量高于内部的，结果见表4。这是因为焙烤过程中，加热过程中面团内部的水蒸气不断转移到表面，且面包表面的温度高于内部，高温高湿条件更有利于SEM的产生。由表4可知，焙烤面包过程中，ADA与SEM的转化率多数大于1%，这一数值与Noonan等人^[10]的结果比较接近，其研究结果为面粉中ADA含量为45 mg/kg时，SEM的检出量为400 μg/kg，但Ye等人^[11]和Becalski等人^[5]测定的转化率分别仅为0.6%~0.7%和>0.1%，远低于本研究的数值。可能是因为面包加工工艺区别较大，面包加热时间、温度不同，导致SEM的转化率也不同。

在市售的面制品中，几乎所有的面包中均检出有SEM，且含量都较高，可能是在面粉中添加了面粉改良剂-偶氮甲酰胺(ADA)。但本实验所购买的馒头、面饼、挂面中几乎没有检出SEM，检出限低于0.4μg/kg。

这与ADA本身的性质有关，ADA能增强面筋的弹性和韧性，使生产出的面包体积大，组织结果较好，而馒头、面饼、挂面一般不需要达到此效果，所以添加ADA的可能性较小；也可能是本实验的取样范围不够广，不能完全说明此类面制品中就不含SEM。

表4 面粉中ADA与制成的面包中SEM转化关系

Table 4 Conversion relationship between ADA in flour and SEM in bread

面粉中 ADA 含量 (mg/kg)	制成的面包的部位	SEM 检出量/(μg/kg)	转化率/%	RSD/%
0	表面	-	-	-
	内部	-	-	-
10	表面	136.4	1.36	6.28
	内部	92.8	0.93	7.05
40	表面	677.2	1.69	6.79
	内部	455.8	1.14	5.88

3 结论

3.1 本文使用弱阳离子交换柱富集和净化不同面制品中氨基脒，采用超高效液相色谱串联质谱技术建立了不同面制品中呋喃西林代谢物-氨基脒的测定方法，方法准确度、灵敏度都较高，能满足不同面制品中氨基脒的定性和定量要求。

3.2 目前对许多食品而言，都是以氨基脒的是否检出来作为是否使用呋喃西林抗生素的判断依据，但许多研究表明，氨基脒不应再作为违法使用呋喃西林的特征标示物。针对氨基脒残留问题，不仅需要强化对硝基呋喃类药物的管理，还要考虑到可能引起氨基脒污染的其他途径，在食品加工中尽量避免氨基脒的污染源。特别是人们日常生活中不可或缺的面包，要想杜绝其中的氨基脒，必须从源头控制，呼吁相关部门重视偶氮甲酰胺与氨基脒的转变关系，重新评估制定偶氮甲酰胺在面粉中的最大使用量，将其控制在一个安全的范围内；或者禁止偶氮甲酰胺作为面粉改良剂，禁止偶氮甲酰胺用在与食品接触的材料中，特别是婴幼儿食品的包装材料。

参考文献

[1] 张仲秋,郑明. 畜禽药物使用手册[M].北京:中国农业大学出版社,2000:74

[2] Szilagy S, de la Calle M B. Semicarbazide in baby food: a European survey [J]. European Food Research and Technology, 2006, 224: 141-146

[3] Leitner A, Zöllner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 939(1-2): 49-58
- [4] 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]. The Analyst, 2004, 129(3): 276-281
- [5] Becalski A, Lau B P, 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
- [6] 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
- [7] Hoenicke K, Gatermann R, Hartig L, et al. Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment: is SEM a specific marker for nitrofurazone abuse [J]. Food Additives and Contaminants, 2004, 21(6): 526-537
- [8] 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
- [9] Becalski A, Lau B P, Lewis D, et al. Semicarbazide in Canadian bakery products [J]. Food Additives and Contaminants, 2006, 23(2): 107-109
- [10] Noonan G O, Warner C R, Hsu W, etc. The determination of semicarbazide (Naminourea) in commercial bread products by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(12): 4680-4685
- [11] Ye J, Wang X H, Sang Y X, et al. Assessment of the determination of azodicarbonamide and its decomposition product semicarbazide: investigation of variation in flour and flour products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(17): 9313-9318

欢迎订阅中文核心期刊 《现代食品科技》

邮发代号：46-349 刊号：ISSN 1673-9078/CN 44-1620