

HPLC-APCI-MS 法快速测定面包中联二脲的含量

Determination of hydrazodicarbonamide in bread by high performance liquid chromatography in tandem atmospheric pressure chemical ionization source mass spectrometry

赵悠悠¹ 花锦¹ 高媛惠¹ 张琪²

ZHAO You-you¹ HUA Jin¹ GAO Yuan-hui¹ ZHANG Qi²

郭海谦³ 张鑫鑫¹ 杨蒲晨¹

GUO Hai-qian³ ZHANG Xin-xin¹ YANG Pu-chen¹

(1. 山西出入境检验检疫局, 山西 太原 030051; 2. 山西农业大学, 山西 太谷 030801;

3. 石家庄市农产品质量检测中心, 河北 石家庄 050021)

(1. Shanxi Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Taiyuan, Shanxi 030051, China;

2. Shanxi Agriculture University, Taigu, Shanxi 030801, China;

3. Shijiazhuang Agricultural Products Quality Testing Center, Shijiazhuang, Hebei 050021, China)

摘要:为快速检测面包中的联二脲(HDC)含量,建立高效液相色谱串联大气压化学电离源质谱(HPLC-APCI-MS)法快速测定面包中联二脲含量的方法。采用 80 °C 水作为提取剂,正己烷萃取除去样品杂质,净化后的样品采用 Xbridge BEH Prep OBD Amide 色谱柱进行分离,以体积比 3 : 7 的水-乙腈溶液为流动相,流速 0.6 mL/min,进行梯度洗脱,大气压化学电离源(APCI)正离子模式电离,多反应监测模式检测,外标法定量,采用添加回收法进行测定。结果表明,该测定方法适用线性范围为 0.2~10.0 mg/L,相关系数为 99.5%~99.9%。室内平均回收率为 82%~110%,实验室内精密密度<10.3%,能够满足一般分析方法的要求。该方法操作简便、快速、灵敏度高,适合面包中联二脲含量的测定。
关键词:高效液相色谱串联大气压化学电离源质谱法;面包;联二脲

Abstract: A method of determining the content of hydrazodicarbonamide (HDC) in bread by high performance liquid chromatography in tandem atmospheric pressure chemical ionization source mass spectrometry (HPLC-APCI-MS) was established. Using 80 °C water as extractant, N-hexane extraction was used to remove sample impurities. And then the samples purified were separated by

using Xbridge BEH Prep OBD Amide column. The gradient elution was performed by using water : acetonitrile (3 : 7) (v/v), with the flow velocity 0.6 mL/min. The ionization were achieved by using APCI source positive ion mode with MRM scan mode. The internal standard calibration curves were used for quantitative. The method of adding-recovery were used to test. The results showed good linearity in the range of 0.2~10.0 mg/L, and the correlation coefficient was 99.5%~99.9%. The indoor average recovery was between 82%~110% and the precision of the laboratory was less than 10.3%, which could satisfy the general requirement of analysis method. Moreover, the method is simple, rapid and sensitive, which is suitable for the determination of HDC in bread.

Keywords: high performance liquid chromatography in tandem atmospheric pressure chemical ionization source mass spectrometry (HPLC-APCI-MS); bread; Hydrazodicarbonamide(HDC)

偶氮甲酰胺(Azodicarbonamide, ADA)具有漂白和氧化双重作用,能改善面制品的组织结构和物理操作性质,主要用于小麦粉处理剂及焙烤食品快速发酵剂中^[1-3],如果在食品中超量使用,可能会对人體腸胃和肝脏造成损伤^[4-5]。现阶段,其在各国应用广泛,推荐用量为 10~300 mg/kg。GB 2760—2014《食品添加剂使用标准》规定小麦粉中 ADA 最大使用量为 45 mg/kg。在面包加工和面粉发酵工序中,ADA 在水的作用下,作为氢受体,能够被面粉蛋白中的巯基还原为联二脲(HDC),在高温焙烤阶段,HDC 可进一步降解为有害的副产物氨基脲(Semicarbazide, SEM),而 SEM 属于致癌

基金项目:山西省科技厅科技攻关项目(编号:20150313015)

作者简介:赵悠悠,女,山西出入境检验检疫局工程师,硕士。

通信作者:花锦(1986—),女,山西出入境检验检疫局工程师,本科。

E-mail:13835149925@163.com

收稿日期:2017—08—22

化学物,可在动物体内存留数周甚至更长^[6-7]。

HDC既是面包加工过程中 ADA 转化的产物,又是 ADA 与 SEM 转化的中间产物^[8-9],所以,准确检测面包 HDC 的含量,对加强卫生监督,保障人体的身体健康具有重要的现实意义。目前关于面及面制品中 ADA 含量的检测有较多研究^[10-11],而 HDC 的检测方法研究较少,如:王雅^[12]采用纯水对样品中的 HDC 进行振荡提取,再经高锰酸钾氧化为 ADA,用 LC-MS/MS 法进行检测,这种方法灵敏度高,但需要进行衍生,操作繁琐;阮莎莎等^[13]用超纯水进行超声提取,离心后取上清,采用同位素内标法进行定量分析,所得样液进行 HPLC-MS/MS 检测,但同位素内标很难获得且很贵,而且电喷雾电离源(ESI)对 HDC 的电离效果没有大气压化学电离源(APCI)效果好。

本研究拟采用大气压化学电离源(APCI),以水溶液作为提取剂,结合 LC-MS/MS 技术对面包中的联二脲进行测定,以期建立一种面包中 HDC 的快速定性定量测定方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

甲酸:色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

乙腈、正己烷:色谱纯,美国天地有限公司;

联二脲标准品:纯度 $\geq 97.0\%$,西格玛奥德里奇贸易有限公司;

N,N-二甲基甲酰胺(DMF):分析纯,西陇科学股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

液相色谱—串联质谱仪:Thermo-Finnigan TSQ Quantum Ultra 型,赛默飞世尔科技公司;

色谱柱:Sepax BR-C₁₈(100 mm \times 2.1 mm,5 μ m,120 \AA)型,赛分科技有限公司;

色谱柱:Xbridge BEH Prep OBD Amide(150 mm \times 3.0 mm,5 μ m,130 \AA)型,美国沃特世科技有限公司;

色谱柱:AgelaVenusil HILIC(150 mm \times 2.1 mm,5 μ m,100 \AA)型,天津博纳艾杰尔科技有限公司;

食品粉碎机:AUX-20A 型,奥克斯集团有限公司;

固相萃取小柱:Supelclean L C-18 型,美国 Supelco 公司;

硅土固相萃取小柱:Florisil 型,天津博纳艾杰尔科技有限公司;

离心机:RJ-LDL-50G 型,无锡市瑞江分析仪器有限公司;

涡旋混匀器:Vortex QL-861 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Xbridge BEH Amide(150 mm \times 460 mm,3.5 μ m);柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.6 mL/min;进样量:10 μ L;流动相:水—乙腈(体积比 3:7)。

1.2.2 质谱条件 离子源:大气压化学电离源(APCI),正离

子模式;离子源温:400 $^{\circ}\text{C}$;喷雾器电流:4 μ A;雾化器压力:0.275 8 MPa;辅助气压力:0.068 9 MPa;离子传输管温度:350 $^{\circ}\text{C}$;定量离子对:119.1/76;定性离子对:119.1/76,119.1/59;碰撞气能量:12,18。

1.2.3 标准曲线的绘制 称取 HDC 标准品 10 mg(精确至 0.01 mg),加水,室温超声至溶解,配成 20 mg/L 的标准储备溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 30 d;根据实际需要用甲醇稀释标准储备液,获得 0.0,0.2,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 mg/L 7 个标准工作液。以不同联二脲浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 面包样液的制备 将采集的市售面包(不含夹心)试样,进行切片并剪碎成小方块,粉碎,置于样品瓶中,密封,并标记。制备好的试样置于-18 $^{\circ}\text{C}$ 冰柜保存。称取试样 1.00 g,置于 50 mL 比色管中,加入 10 mL 80 $^{\circ}\text{C}$ 热水,充分旋涡混合 1 min,80 $^{\circ}\text{C}$ 超声提取 10 min,8 500 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL 于 10 mL 塑料离心管中,加入 1.0 mL 正己烷,充分旋涡混合 1 min,8 500 r/min 离心 5 min,取下层水层过水系微孔滤膜,供液相色谱分析。

1.2.5 方法回收率和精密度的测定 对面包基质采用添加回收法进行测定,即对面包基质做未添加联二脲和添加联二脲的试验,添加水平:0.5,1.0,5.0 mg/kg。每个浓度水平进行 6 次重复试验,测得联二脲在不同基质中的回收率。同时,以不加样品为空白对照,除不加样品外,按照试样处理步骤进行处理。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理的优化

2.1.1 提取液、提取方式的选择 HDC 微溶于水、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),不溶于多数有机溶剂^[14-16],本研究尝试了水、甲醇、乙腈、5% DMF 水溶液作为提取剂进行试验,发现甲醇和乙腈的提取效率较低,水和 5% DMF 水溶液效果相近,考虑到 DMF 黏性较大,最终选择水作为提取剂。由于在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)下联二脲在水中的溶解度较小,通过比较不同温度下水的提取效率,最终确定 80 $^{\circ}\text{C}$ 水作为提取剂。详见表 1。

2.1.2 净化条件的选择 本试验普遍存在基质效应,尝试了 C₁₈、佛罗里硅土固相萃取小柱净化,净化后在色谱图中未发现明显不一致的色谱杂峰,则采用简单的液液萃取方法就能满足要求。部分面制品如方便面、麻花及面包中含有油脂色素,可采用正己烷萃取除去杂质^[17],同时,正己烷萃取材料简

表 1 提取溶剂对联二脲提取效果的影响

Table 1 Effects of different extraction solvents on the extraction effect of HDC

提取溶剂	回收率/%
5% DMF	73~86
室温水	70~91
80 $^{\circ}\text{C}$ 水	87~96
乙腈	43~58
甲醇	57~72

单,便于操作,净化后联二脲信号无影响,因而选取正己烷液萃取净化方法。

2.2 液相色谱条件的选择

尝试了不同的流动相、不同配比流动相、不同流速,具体液相色谱的检测条件见表 2。结果显示,30%水+70%乙腈为流动相,流速 0.6 mL/min 时色谱峰响应值最高,峰型最好。

表 2 液相色谱条件优化表

Table 2 Optimization of the conditions of liquid chromatography

流动相 A	流动相 B	流速/(mL·min ⁻¹)
20%水	80%乙腈	0.5,0.6,0.8
30%水	70%乙腈	0.5,0.6,0.8
20%水	0.1%甲酸-乙腈	0.5,0.6,0.8
20%水	0.2%甲酸-乙腈	0.5,0.6,0.8

通过采用 3 种正反相色谱柱,对 HDC 的保留情况进行了试验,结果见图 1、2。

由于 HDC 极性较强,在 Sepax BR-C₁₈ 色谱柱上没有保留,而在正相色谱柱上均有保留,在 Xbridge BEH Prep OBD Amide 色谱柱的峰型和响应强度比 AgelaVenusil HILIC 的效果好,因此选择 Xbridge BEH Prep OBD Amide 色谱柱。

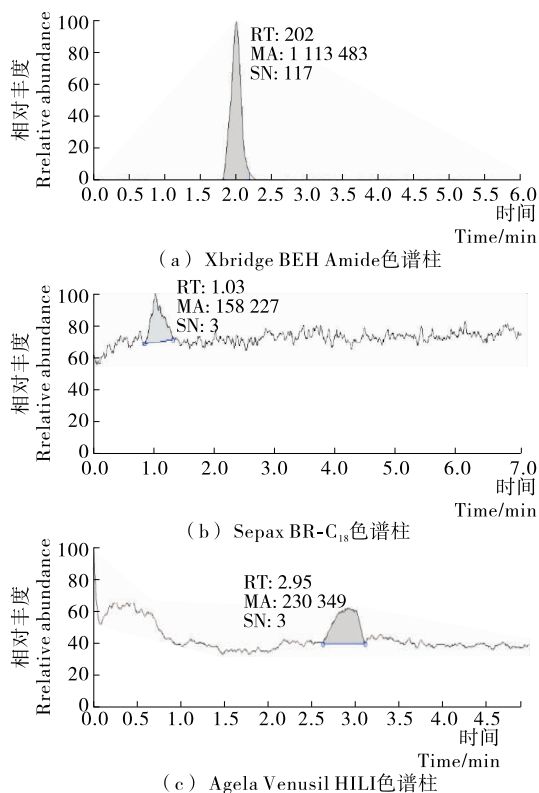


图 1 联二脲 3 种色谱柱分离色谱图

Figure 1 Separation chromatograms of 3 chromatographic column of standard HDC

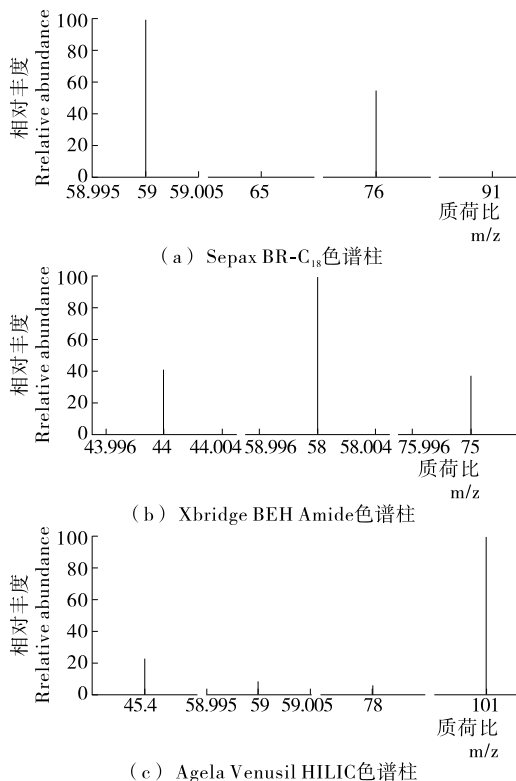


图 2 联二脲 3 种色谱柱分离质谱图

Figure 2 Mass chromatograms of 3 chromatographic column of standard HDC

2.3 质谱/质谱参考条件

大气压化学电离源主要用来分析中等极性的化合物。有些分析物由于结构和极性方面的原因,用 ESI 不能产生足够强的离子,可以采用 APCI 方式增加离子产率;APCI 的特点是检测限低,易于与 GC 或 LC 连接^[18-19]。样品分子在 EI 中的绝对离子化效率为 0.01%~0.10%,而 APCI 的离子化效率几乎是 100%。研究了联二脲的质谱条件,证明联二脲母离子([M+H]⁺+m/z 119)在正大气压化学电离条件下有较强的灵敏度,所以选择大气压化学电离条件下的正离子模式。

采用注射泵直接进样方式,以 5 μL/min 的流速将联二脲标准液(1 μg/mL)注入串联质谱的离子源中。采用正离子扫描方式进行一级质谱分析,确定了准分子离子峰(M+1),对准分子离子峰进行了透镜电压优化,使信号增大。通过被测物的准分子离子碰撞后,优化了碰撞能量,找出响应信号最高的 2 个碎片离子作为定量、定性离子。同时还对离子源温度、鞘气、辅助气等参数进行了优化。优化后得到联二脲的色谱图见图 3。

2.4 标准曲线

以峰面积-浓度绘制标准曲线见图 4。由图 4 可知,浓度为 0.2~10.0 mg/L 时线性良好,线性方程 $y = 19\ 692x + 33\ 577$,相关系数为 99.5%~99.9%。

2.5 定性、定量方法

(1) 定性:按照上述 1.2 的条件测定试样和标准工作溶液,如果试样中的质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致

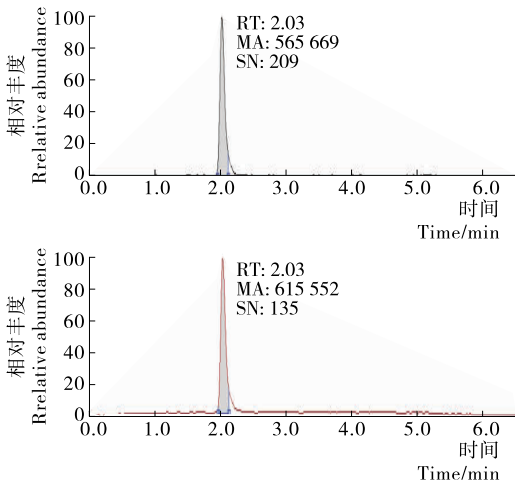


图3 联二脒标准品色谱-质谱图

Figure 3 Chromatography-mass spectrogram of standard HDC

(变化范围在±2.5%);样品中目标化合物定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液一致,相对丰度偏差符合SN/T 0001—2016标准的要求,则可判断样品中存在联二脒。

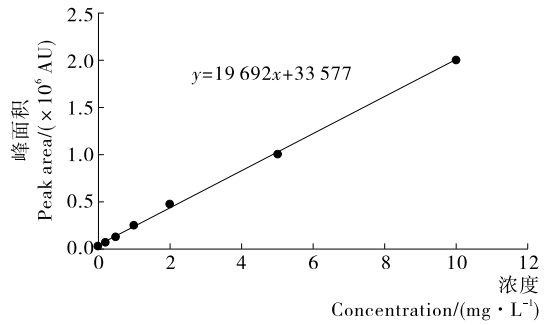


图4 联二脒标准工作曲线

Figure 4 The standard work curve of HDC

(2) 定量:用基质标准工作曲线对样品进行定量。

2.6 方法的测定低限、回收率和精密度

采用信噪比≥10的要求,计算并测得联二脒的测定低限为0.5 mg/kg。联二脒属于禁用物质,按照SN/T 0001—2016标准规定,选择3个水平的浓度做回收率试验,其中检出限水平的添加回收见图5,回收率及精密度见表3。由表3可知,该方法的室内平均回收率82%~110%,实验室内精密度<10.3%,能够满足一般分析方法的要求。

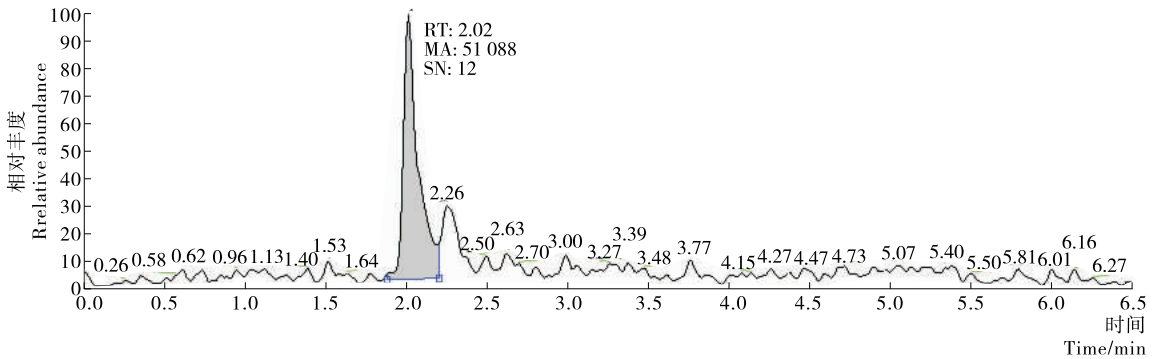


图5 面包加标色谱图(添加水平:0.5 mg/kg)

Figure 5 Chromatography spectrogram of bread with standard (Addition level: 0.5 mg/kg)

表3 不同添加水平的回收率及精密度

Table 3 The recovery and precision of HDC in bread (n=6)

添加水平/(mg · kg ⁻¹)	实测值/(mg · kg ⁻¹)	回收率/%	RSD/%
0.5	0.42	84.0	3.4
1.0	0.87	87.0	3.3
5.0	4.89	97.8	4.1

3 结论

本研究建立了超高效液相色谱串联质谱—大气压电离正离子测定面包中联二脒的检测方法,该法快速、简单、有效、回收率高。但该方法只研究了面包中的联二脒检测,日后希望能够多增加一些其他基质,如:方便面或小麦粉及其制品中的联二脒检测,使方法更加成熟。

参考文献

[1] 王远成,周晓邑. 偶氮甲酰胺面粉粉质及面包质量的影响[J]. 中

国粮油学报, 2001, 16(1): 32-35.

[2] 谢洁,彭涛,刘彩虹,等. 面包中偶氮甲酰胺及其降解产物的风险分析[J]. 检验检疫学刊, 2014(4): 62-66.

[3] 袁丽红,丁洪流,陈英,等. 面粉添加剂偶氮甲酰胺代谢物联二脒的HPLC-MS/MS检测[J]. 食品工业科技, 2013, 34(10): 73-76.

[4] BECALSKI A, LAU B P Y, DAVID LEWIS A, et al. Semicarbazide Formation in Azodicarbonamide-Treated Flour: A Model Study[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(18): 5 730-5 734.

[5] 国家卫计委. GB 2760—2014 国家食品安全标准 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 1-5.

[6] WANG Min-juan, NIE Xiao-ling, TIAN Li, et al. Investigation on the contamination of semicarbazide in baked foods and its dietary exposure assessment in Shaanxi Province[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2017, 29(3): 360-364.

[7] 李嘉. 食品添加剂副产物氨基脒的毒理学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008: 1-20.

(下转第134页)

- 2015, 63(1): 519-526.
- [12] COMA V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products[J]. *Meat Science*, 2008, 78(1/2): 90-103.
- [13] OTONI C G, ESPITIA P J P, AVENA-BUSTILLOS R J, et al. Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads[J]. *Food Research International*, 2016, 83: 60-73.
- [14] DEHNAD D, MIRZAEI H, EMAM-DJOMEH Z, et al. Thermal and antimicrobial properties of chitosan-nanocellulose films for extending shelf life of ground meat[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 109: 148-154.
- [15] 谭英. 钛表面聚多巴胺-纳米银复合膜层的构建及抗菌性能研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2014: 3-4.
- [16] MARAMBIO J C, HOEK E M V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 12(5): 1 531-1 551.
- [17] 莫名月, 李国明. 壳聚糖及壳聚糖-羧甲基纤维素钠复合囊材的体外降解性能研究[J]. *广东化工*, 2009, 36(6): 50-51, 254.
- [18] 卢唱唱, 许琦场, 徐丹. 蒙脱土对纤维素基吸湿衬垫结构与性能的影响[J]. *包装工程*, 2016, 37(11): 6-10.
- [19] 许琦场, 秦海容, 郭凡, 等. 茶多酚复合衬垫的性能及其对鲜肉的保鲜效果[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(1): 246-251.
- [20] KIM G D, JUNG E Y, LIM H J, et al. Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork[J]. *Meat Science*, 2013, 95(2): 323-329.
- [21] JIANG Yi, LU Yong-lai, ZHANG Li-qun, et al. Preparation and characterization of silver nanoparticles immobilized on multi-walled carbon nanotubes by poly(dopamine) functionalization[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012, 14(6): 1-10.
- [22] WANG Dan-feng, WANG Xi-chang, LIU Tai-ang, et al. Prediction of total viable counts on chilled pork using an electronic nose combined with support vector machine[J]. *Meat Science*, 2012, 90(2): 373-377.
- [23] NYCHAS G J E, SKANDAMIS P N, TASSOU C C, et al. Meat spoilage during distribution[J]. *Meat Science*, 2008, 78(1/2): 77-89.
- [24] ZHU Si-chao, LUO Yong-kang, HONG Hui, et al. Correlation between electrical conductivity of the gutted fish body and the quality of bighead carp (*aristichthys nobilis*) heads stored at 0 and 3 °C[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6(11): 3 068-3 075.
- [25] 马丽珍, 南庆贤, 戴瑞彤. 不同气调包装方式对冷却猪肉在冷藏过程中的理化及感官特性的影响[J]. *农业工程学报*, 2003, 19(3): 156-160.
- [26] 孔宝华, 韩建春. *肉品科学与技术*[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2011: 122-123.
- [27] MUELA E, SANUDO C, CAMPO M M, et al. Effect of freezing method and frozen storage duration on instrumental quality of lamb throughout display[J]. *Meat Science*, 2010, 84(4): 662-669.
- [28] 魏心如, 赵颖, 韩敏义, 等. 冷却鸡肉保水性评定指标标准化及其与肉色、嫩度和 pH_{24h}相关性研究[J]. *食品科学*, 2014, 35(21): 50-56.

(上接第 63 页)

- [8] 李水芳, 单杨. 近红外透反射光谱用于检测蜂蜜加入麦芽糖浆掺假[J]. *食品科技*, 2010, 32(12): 299-303.
- [9] 王青云, 王越. 酶解法测定多种糖混合体系中海藻糖的含量[J]. *现代食品科技*, 2015, 31(6): 329-333.
- [10] CHEN Jia, ZHU Shi-pin. Rapid determination of total protein and wet gluten in commercial wheat flour using siSVR-NIR[J]. *Food Chemistry*, 2017, 221: 1 939-1 946.
- [11] 公丽艳, 孟宪军. 基于主成分与聚类分析的苹果加工品质评价[J]. *农业工程学报*, 2014, 30(13): 276-283.
- [12] 林海明, 张文霖. 主成分分析与因子分析的异同和 SPSS 软件: 兼与刘玉玫、卢纹岱等同志商榷[J]. *统计研究*, 2005(3): 65-68.
- [13] 李硕, 汪善勤. 基于可见-近红外光谱比较主成分回归、偏最小二乘回归和反向传播神经网络对土壤氮的预测研究[J]. *光学学报*, 2012, 32(8): 1-5.
- [14] 陈大伟, 闫绍, 刘昊岩. SVD 系列算法在评分预测中的过拟合现象[J]. *山东大学学报: 工学版*, 2014, 44(3): 15-21.

(上接第 67 页)

- [8] 姚敬, 黄伟雄, 李少霞, 等. 小麦粉制品中氨基脲的检测及与偶氮甲酰胺的转化规律研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016(18): 2 600-2 602.
- [9] 向露. 面粉及其制品中偶氮甲酰胺、氨基脲检测方法及偶氮甲酰胺降解规律研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014: 2-30.
- [10] 刘莎, 郭晓娜, 刘刚, 等. 基于蛋白交联探究偶氮甲酰胺对馒头品质影响的机理[J]. *食品与机械*, 2016, 32(4): 9-13.
- [11] 周启明, 向露, 王俊苏, 等. 液相色谱-串联质谱研究面粉及其制品中偶氮甲酰胺降解规律及氨基脲污染水平[J]. *分析试验室*, 2014(7): 782-786.
- [12] 王雅. 面粉及制品中偶氮甲酰胺、联二脲的液相色谱串联质谱检测技术及应用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014: 2-20.
- [13] 阮莎莎, 刘桂华, 刘素纯, 等. 同位素稀释高效液相色谱-串联质谱法测定面粉及面制品中的联二脲[J]. *分析测试学报*, 2016, 35(4): 420-425.
- [14] YUAN Li-hong, DING Hong-liu, CHEN Ying, et al. HPLC-MS/MS analysis of biurea metabolized by flour additive azodicarbonamide [J]. *Science & Technology of Food Industry*, 2013, 34(10): 73-76.
- [15] MULDER P P J, BEUMER B, RHIJN J A V. The determination of biurea: A novel method to discriminate between nitrofurazone and azodicarbonamide use in food products [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586(1/2): 366-373.
- [16] 王雅, 王俊苏, 向露, 等. 液相色谱-串联质谱法测定面粉及其制品中的联二脲[J]. *色谱*, 2014(5): 513-518.
- [17] NOONAN G O, BEGLEY T H, DIACHENKO G W, et al. Semicarbazide formation in flour and bread[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2008, 56(6): 2 064-2 067.
- [18] GAN Heng-hui, YAN Bing-nan, LINFORTH Robert S T, et al. Development and validation of an APCI-MS/GC-MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. [J]. *Food Chemistry*, 2016, 190(7): 442-447.
- [19] 宣宇. LC/APCI/MS 对粉尘和水样中单质炸药的分析及应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2012: 1-15.