

实验技术与方法

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定啤酒中4-甲基咪唑的含量

李建平, 渠志华, 王辰, 马永民

(天津市疾病预防控制中心卫生检测所, 天津 300011)

摘要:目的 建立啤酒中4-甲基咪唑的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱检测方法。方法 样品经水提取, Agala PCX 固相萃取柱净化, 经色谱柱 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离, 超高效液相色谱-串联质谱多反应监测(MRM)模式测定, 内标法定量。结果 方法的线性范围为1.0~200 μg/L, 标准曲线线性相关系数为0.999 3, 检出限为6 μg/kg。高、中、低3个浓度水平的加标回收率为88.2%~89.6%, 相对标准偏差小于5%。结论 本方法灵敏、快速、准确, 可用于啤酒中4-甲基咪唑的测定。

关键词:啤酒; 4-甲基咪唑; 固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱; 食品污染物; 风险监测; 检测

中图分类号: R155.5 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)05-0610-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.05.011

Detection of 4-methylimidazole in beer by solid-phase extraction coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Jian-ping, QU Zhi-hua, WANG Chen, MA Yong-min

(The Physical and Chemical Laboratory of the Department of Health Detection in Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China)

Abstract: Objective To establish a method for the detection of 4-methylimidazole in beer by solid-phase extraction (SPE) coupled with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods**

Samples were extracted by water and purified by Agala PCX solid phase extraction column, then the sample was separated in a Waters ACQUITY BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The 4-methylimidazole was determined by UPLC-MS/MS in the multiple-reaction monitoring (MRM) mode and quantified by internal standard. **Results** The calibration curve had a good linearity in the range of 1.0-200 μg/L with correlation coefficient of 0.999 3. The detection limit was 6 μg/kg. The average recoveries at three spiked levels were in the range of 88.2% -89.6%, and the relative standard derivation was below 5%. **Conclusion** The method is simple, rapid, sensitive and accurate, which could be used for the detection of 4-methylimidazole in beer.

Key words: Beer; 4-methylimidazole; solid-phase extraction; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; food contaminant; risk monitoring; detection

焦糖色是我国允许使用的一种食用着色剂, 应用广泛, 涵盖食品、酿酒、制药等多个领域。国际上通常按其生产工艺把焦糖色分为四类: I 普通焦糖; II 亚硫酸钾钠焦糖; III 氨焦糖; IV 亚硫酸铵焦糖。我国 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[1]中规定啤酒中 III、IV 类焦糖色使用限量为 50 g/L。III、IV 类焦糖色在生产过程中会产生一定量的有害物质 4-甲基咪唑(4-methylimidazole, 4-MEI), GB 8817—2001《食品添加

剂 焦糖色(亚硫酸铵法、氨法、普通法)》^[2]中规定, 4-甲基咪唑在焦糖色中含量小于 0.02%, 然而啤酒并无相关卫生标准。

研究表明^[3-4], 4-MEI 能导致动物长肿瘤, 有可能给人体带来致癌风险, 2007 年美国国家毒理学计划(NTP)将其列为致癌物^[5]。2011 年《加州 65 号提案》确定其无显著风险水平(NSRL)为每天 0.045 mg/kg^[6]。目前, 4-MEI 检测方法主要有分光光度法^[7]、色谱法^[8-12]和色谱-质谱联用法^[13-18]等。国内对 4-MEI 的检测主要集中于焦糖色原料, 其次是对其相关食品酱油和可乐, 对啤酒中 4-MEI 含量测定鲜见报道。本研究建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定啤酒中 4-MEI 含量, 旨在为啤酒的安全性评价以及相关标准的制定提供技术支持。

收稿日期: 2016-06-20

作者简介: 李建平 男 主管技师 研究方向为食品、环境卫生检验

E-mail: LJPI00@163.com

通信作者: 马永民 男 主任技师 研究方向为食品、环境卫生检验

E-mail: 13662055367@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器与试剂

ACQUITY™ UPLC-TQD MS/MS 液质联用仪(美国 Waters)、高速离心机、十万分之一电子天平、XW80-A 漩涡振荡器、KQ-200KDB 型超声波清洗器、真空过柱装置。

Agala PCX 固相萃取柱(天津博纳艾杰尔公司,60 mg/3 ml),临用前依次用3 ml 甲醇活化和3 ml 水平衡;4-MEI 标准品(10307,含量99.4%,德国 Dr. Ehrenstorfer),4-MEI-D₅(M191P12,98.7%,加拿大 C/D/N ISOTopes),乙腈、甲醇、甲酸(纯度≥98%)均为色谱纯,氨水(分析纯),盐酸(优级纯),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

4-甲基咪唑标准储备液的配制:称取4-MEI 6.29 mg(精确至0.000 1 g),用水溶解后转移至25 ml 容量瓶中,加水定容,配制成质量浓度为250 μg/ml 的标准储备液,于4 ℃条件下保存。精密量取上述储备液适量,加水制成每1 ml 含1.0 μg 的标准使用液,用于标准曲线的配制。

4-MEI-D₅ 标准储备液的配制:称取4-MEI-D₅ 9.38 mg(精确至0.000 1 g),用水溶解后转移至25 ml 容量瓶中,加水定容,配制成质量浓度为370 μg/ml 的标准储备液,于4 ℃条件下保存。精密量取上述储备液适量,加水制成每1 ml 含0.5 μg 的对照内标使用液。

1.2.2 样品处理

提取:将啤酒倒入烧杯中超声10 min 除尽二氧化碳,取约5.0 g(精确至0.01 g)于100 ml 容量瓶中,加入水至刻度,混匀。10 000 r/min 离心5 min,取上清液备用。

净化:移取约1.00 ml 提取液加入1.8 ml 水,加入100 μl 0.02 mol/L 盐酸溶液,加入100 μl 内标使用液,混匀后倾入已活化的固相萃取小柱中,待液体全部流出后,用3 ml 水、3 ml 甲醇淋洗小柱,用3 ml 含5%氨水的甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,置于45 ℃水浴氮吹浓缩至干,残渣用1.00 ml 水溶解,过0.22 μm 滤膜后,待测。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:色谱柱 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm,1.7 μm),柱温30 ℃;进样体积10 μl;流动相A为5 mmol/L 甲酸铵,流动相B为乙腈,梯度洗脱,梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流速/(ml/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.25	95	5
0.50	0.25	95	5
1.50	0.25	60	40
1.51	0.25	10	90
2.00	0.25	10	90
2.01	0.25	95	5
3.00	0.25	95	5

质谱条件:离子源:电喷雾离子源(ESI+);扫描方式:多反应监测(MRM)。毛细管电压0.5 kV,离子源温度150 ℃,脱溶剂气温度450 ℃,脱溶剂气流量700 L/h,其他参数见表2。

表2 4-MEI 的质谱参数

Table 2 MS parameters for 4-MEI

化合物	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
4-MEI	82.97	56.23*,28.08	13,15	33
4-MEI-D ₅	88.04	61.08	15	33

注:*为定量离子

2 结果与分析

2.1 固相萃取柱的选择

4-MEI 是极性较强的碱性杂环化合物,因此阳离子固相萃取柱对其有较高的选择性和灵敏度。本研究比较了4种阳离子固相萃取柱:Agala Cleanert PCX(60 mg/3 ml)、Thermo CX(60 mg/3 ml)、Waters Oasis MCX(60 mg/3 ml)和 Isolute HCX(60 mg/3 ml)的萃取效率。采用纯水加4-MEI-D₅ 内标,过柱净化后计算柱子的绝对回收率,结果见表3。试验结果表明,PCX 和 CX 回收率较高,因此本试验采用PCX 固相萃取柱。

表3 固相萃取柱回收率及精密度比较(n=6,%)

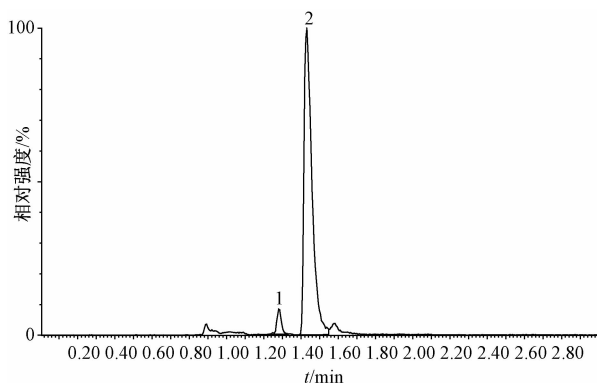
Table 3 Recoveries and precisions of different SPE columns

固相萃取柱	平均回收率	RSD
MCX	43.0	4.54
PCX	77.4	2.27
HCX	56.5	14.6
CX	73.5	4.88

2.2 仪器条件选择

2.2.1 色谱柱选择

4-MEI 是强极性化合物,在反相C₁₈柱上不易保留。本试验首先采用ACQUITY UPLC® HSS T₃(2.1 mm × 100 mm,1.8 μm)亲水色谱柱进行条件摸索。HSS T₃柱上4-MEI 保留较好,灵敏度高,但在实际样品测定中存在样品基质干扰。采用ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm)色谱柱,可降低乙腈比例实现了目标峰与干扰组分的完全分离,见图1。



注:1为4-MEI;2为干扰峰

图1 啤酒色谱图

Figure 1 Chromatogram of beer

2.2.2 流动相的选择

4-MEI具有较强的亲水性,在色谱柱上的保留较弱,为了兼顾4-MEI在色谱柱上的保留与质谱上的响应,对乙腈-5 mmol/L 甲酸铵、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵和乙腈-水三种流动相体系进行了考察。结果表明,5%乙腈比例3种流动相保留时间差别不大,但在乙酸铵和水体系下,4-MEI色谱峰拖尾严重,灵敏度下降近10倍。因此本试验采用乙腈-5 mmol/L甲酸铵作为流动相,色谱峰峰形较好,灵敏度高,见图2。

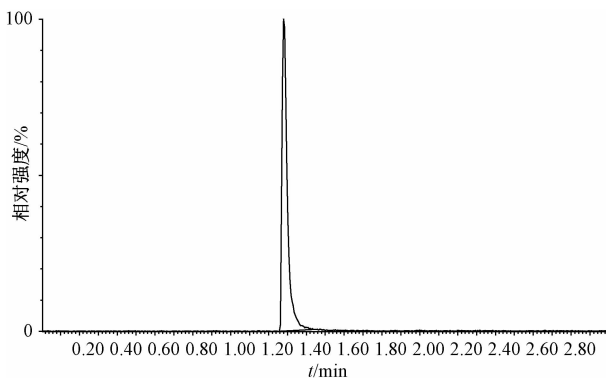


图2 4-甲基咪唑标准色谱图

Figure 2 Chromatogram of 4-MEI

2.2.3 质谱条件选择

本试验采用超高效液相色谱-串联质谱法进行测定,具有更高的灵敏度和选择性。试验中,通过直接进样法确定4-MEI母离子质量数(m/z 82.97),在此基础上优化碰撞能进行子离子扫描,得到 m/z 为56.23、42.13、28.08三个子离子,选择丰度最高的 m/z 56.23作为定量离子,由于 m/z 42.13在样品测定时有干扰,故而选择 m/z 28.08作为定性离子。

2.3 检出限、精密度、回收率及线性范围

分别移取一定体积的4-MEI标准使用液于

1.5 ml进样瓶中,加入100 μ l 4-MEI-D₅内标使用液,加水补足至1 ml。配制成4-MEI浓度分别为1.00、2.00、5.00、20.0、50.0、100和200 μ g/L的标准曲线,进样测定,以4-MEI定量离子的峰面积与内标峰面积的比值对4-MEI浓度进行线性回归,线性方程为 $y = 0.04174x - 0.06122$,相关系数 r 为0.9993,表明4-MEI在1~200 μ g/L范围内线性关系良好,以3倍信噪比计算4-MEI检出限为6 μ g/kg。

取已知浓度的啤酒样品分别加入高、中、低3种浓度水平的4-MEI进行测定,计算回收率,如表4所示,3个加标浓度水平下所得平均回收率均在88.2%~89.6%之间,相对标准偏差均小于5%。

表4 方法回收率和精密度($n=6$)

Table 4 Recoveries and precisions of determination

样品含量 /(mg/kg)	加标值 /(mg/kg)	测定值 /(mg/kg)	回收率 /%	RSD /%
0.0598	0.1	0.148	88.2	0.42
	0.5	0.508	89.6	2.44
	2.0	1.85	89.5	1.64

2.4 实际样品测定

应用该方法对市场随机购买的11种啤酒进行检测,4-MEI均有检出,含量在0.0523~0.390 mg/kg之间。

3 小结

采用固相萃取净化样品,超高效液相色谱-串联质谱法测定啤酒中4-甲基咪唑含量,样品处理简单,方法灵敏度高,准确度高,分析时间短,大大提高了工作效率,同时也为啤酒的食用安全性评价提供了技术支撑。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760—2014 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,2014.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 8817—2001 食品添加剂 焦糖色(亚硫酸铵法、氨法、普通法)[S]. 北京:中国标准出版社,2001.
- [3] CHAN P C, Hills G D, Kissling G E, et al. Toxicity and carcinogenicity studies of 4-methylimidazole in F344/N rats and B6C3F1 mice[J]. Arch Toxicol, 2008, 82(1):45-53.
- [4] Haseman J K. Evaluating consistency in the interpretation of NTP rodent cancer bioassays: an examination of mouse lung tumor effects in the 4-MEI study[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2013, 66(1):109-115.
- [5] National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of 4-methylimidazole (CAS No. 822-36-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (see studies)[J]. NTP Technical Report Series, 2007, 535:1-274.

- [6] OEHHHA. No significant risk level (NSRL) for the proposition 65 carcinogen 4-methylimidazole [S]. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHHA) California Environmental Protection Agency, 2011.
- [7] 黄志勤, 屈海云. 分光光度法测定焦糖色中 4-甲基咪唑[J]. 中国调味品, 2005(6):52-54.
- [8] 荣维广, 宋宁慧, 阮华, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定焦糖色素中副产物 2-甲基咪唑、4-甲基咪唑和 2-乙酰基-4-(1,2,3,4-四羟丁基)咪唑[J]. 分析化学, 2015, 43(5):742-774.
- [9] 孙梓宇, 罗群, 罗庆铭, 等. SPE 萃取-离子对高效液相色谱法测定可乐中 4-甲基咪唑[J]. 广东化工, 2014, 41(7):188-189.
- [10] 彭向前, 冯玮, 石海英. 气相色谱法同时检测焦糖色素中的 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 中国调味品, 2012, 37(8):83-85.
- [11] 张晓燕, 芦春梅, 郭娜, 等. 高效液相色谱法测定饮料中的 4-甲基咪唑[J]. 中国酿造, 2013, 32(5):148-150.
- [12] 王淼, 陈海珍. 高效液相色谱法测定焦糖中 4-甲基咪唑的含量[J]. 中国处方药, 2015, 13(10):25-26.
- [13] 熊珺, 陈美玲, 赖毅东. 固相萃取-选择离子气质联用法测定液
态调味料中的 4-甲基咪唑[J]. 现代食品科技, 2012, 28(5):567-569.
- [14] 张璐, 孔祥虹, 何强. UPLC-MS-MS 检测饮料中的 4-甲基咪唑及其同分异构体 2-甲基咪唑[J]. 食品科学, 2014, 35(8):244-248.
- [15] 吴玉鑫, 洗燕萍, 郭新东, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定酱油中的 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(5):1357-1363.
- [16] 王丽英, 任贝贝, 杨立新, 等. 同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法测定酱油、醋和饮料中的 4-甲基咪唑[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(3):962-967.
- [17] Goscinnny S, Hanot V, Trabelsi H, et al. Determination of caramel colorants' by-products in liquid foods by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. Food Additives and Contaminants: Part A, 2014, 31(10):1652-1660.
- [18] XU X B, LIU D B, YU S J, et al. Separation and determination of 4-methylimidazole, 2-methylimidazole and 5-hydroxymethyl-furfural in beverages by amino trap column coupled with pulsed amperometric detection [J]. Food Chemistry, 2015, 169:224-229.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的黄曲霉毒素 M₁

刘颖¹, 周鑫², 刘晓光³, 熊亚南¹

(1. 华北理工大学基础医学院 河北省慢性疾病重点实验室 唐山市慢性病临床基础研究重点实验室, 河北唐山 063000; 2. 唐山市畜牧水产品质量监测中心, 河北唐山 063000; 3. 华北理工大学生命科学院, 河北唐山 063000)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱测定牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的方法。方法 采用 Acquityuplc BEH C₁₈液相色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 梯度洗脱, 多反应监测(MRM)。通过黄曲霉毒素 M₁ 与免疫亲和柱中抗体结合, 确定了从牛奶中提取黄曲霉毒素 M₁ 的处理条件并优化了质谱的测定参数。结果 黄曲霉毒素 M₁ 在 0.1~10.0 ng/ml 的范围内线性良好, 其回归标准曲线方程的相关系数为 0.997 8, 回收率 94.8%~98.2%, RSD 为 2.34%~3.87%, 方法定量限为 0.005 μg/kg。结论 提供了一种有效检测牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的方法。

关键词:牛奶; 黄曲霉毒素 M₁; 超高效液相色谱-串联质谱; 食品污染物; 检测方法

中图分类号:R155 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2016)05-0613-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.05.012

Determination of aflatoxin M₁ in milk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Ying, ZHOU Xin, LIU Xiao-guang, XIONG Ya-nan

(Hebei Province Key Laboratory on Chronic Diseases, Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, College of Basic Medicine, North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed

收稿日期:2016-02-18

作者简介:刘颖 女 主管药师 研究方向为食品安全与质量控制 E-mail:48245531@qq.com

通信作者:熊亚南 女 副教授 研究方向为食品安全与质量控制 E-mail:492377@qq.com