

使用ACQUITY UPLC I-Class和Xevo TQ-S micro测定加工食品中的丙烯酰胺

Euan Ross, Joanne Williams

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍一种全新的LC-MS/MS方法，该方法将ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S micro联用以测定丙烯酰胺。该方法为加工食品基质（包括薯片、咖啡、面包和婴儿食品）中丙烯酰胺的定量提供了一种快速、经济有效的方案。

优势

使用快速、经济有效的方法定量分析加工食品基质（包括薯片、咖啡、面包和婴儿食品）中的丙烯酰胺

简介

丙烯酰胺是一种强极性水溶性化合物，多用于工业加工流程和纺织品生产。丙烯酰胺也是一种食品污染物，可在食品生产过程中通过高温(+120 °C)烹饪形成¹。其形成过程中发生的主要化学反应被称为美拉德反应²。丙烯酰胺的毒理学性质已经有大量研究，其具有神经毒性、基因毒性、致癌性和生殖毒性。国际癌症研究机构(IARC)已将丙烯酰胺列为2A类致癌物³。

丙烯酰胺存在于各种日常食品中，因此所有消费者均面临这一健康问题，按体重计算剂量，儿童是暴露量最大的年龄组。炸薯条、薯片、饼干和咖啡对人的丙烯酰胺膳食暴露量影响最大。最近有报道称油炸马铃薯产品中的丙烯酰胺含量超过1000 µg/kg⁴。

2015年6月，欧洲食品安全局(EFSA)发布了第一份针对食品中丙烯酰胺的完整风险评估报告¹。EFSA食品链污染物专家组(CONTAM)再次确认了之前的评估结论，即食品中的丙烯酰胺可能会增加所有年龄组的消费者罹患癌症的风险¹。

到目前为止，欧洲尚未规定食品中丙烯酰胺的最高限量。食品行业已经开展了大量工作来确定并实施降低食品中丙烯酰胺浓度的措施。其中包括制定相关指南，提供限制各种食品和工艺中丙烯酰胺形成的方法。2018年4月生效的欧盟法规2017/2158规定了相应的缓解措施和基准浓度，旨在降低食品中的丙烯酰胺浓度⁵。新法规将要求食品经营者在其食品安全管理体系中采用简单、实用的步骤管理丙烯酰胺。

本应用纪要介绍了对使用Waters ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S micro串联四极杆质谱仪测定各种代表性食品中丙烯酰胺的方法进行内部验证得到的结果。

实验

样品前处理和样品提取

称取1 g均质化食品样品，通过用于UPLC MS/MS的改良版QuEChERS丙烯酰胺启动方法包（部件号：[176004417 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/176004417-acrylamide-starter-kit-lc-ms.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/176004417-acrylamide-starter-kit-lc-ms.html)）进行提取。开始提取前，向所有样品中加入同位素标记的内标（丙烯酰胺d3），以便校正在提取、净化和LC-MS/MS分析过程中的任何差异。

使用包含300 mg N-丙基乙二胺(PSA)吸附剂和900 mg MgSO₄的分散固相萃取(dSPE)管（用于UPLC MS/MS的丙烯酰胺启动方法包，部件号：[176004417 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/176004417-acrylamide-starter-kit-lc-ms.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/176004417-acrylamide-starter-kit-lc-ms.html)）对改良版QuEChERS提取方法得到的上清液进行净化。将提取物蒸干后复溶于0.1%甲酸的水溶液（LC-MS级）中以完成浓缩步骤，并将溶剂交换为较弱的进样稀释剂。有关本丙烯酰胺应用纪要可用消耗品套装的更多信息，请访问[waters.com/acrylamide](https://www.waters.com/acrylamide)。该网站可按要求提供样品提取的全部详细信息([www.waters.com/acrylamide <https://www.waters.com/waters/form.htm?id=135008043&alias=ALIAS_acrylamide_FOOD&changedCountry=Y&lset=1>](https://www.waters.com/waters/form.htm?id=135008043&alias=ALIAS_acrylamide_FOOD&changedCountry=Y&lset=1))。

根据欧盟委员会法规(EU) 2017/2158中的标准评估方法性能。通过测量加标样品和用作参考物质的FAPAS测试样品（薯片和咖啡）评估方法的正确度和精密度。部分代表性商品的加标浓度为50 µg/kg和200 µg/kg，但婴儿食品除外，其加标浓度较低，为40 µg/kg。用水配制浓度范围为0.5~2500 ng/mL的校准标样。对分段校准曲线之间两种浓度的校准标样进行重复进样分析(n=15)，评估该LC-MS/MS方法的精密度和正确度。

UPLC条件

UPLC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ SB, 1.8 µm, 2.1 × 100 mm, 用于UPLC MS/MS的丙烯酰胺启动方法包 (部件号: 176004417)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	5 µL (带针溢出的部分定量环进样)
流速:	0.2 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液 (LCMS级)
流动相B:	甲醇 (LCMS级)
梯度:	完整梯度条件需要访问 waters.com/acrylamide 进行查看

MS条件

MS系统:	Xevo TQ-S micro
-------	-----------------

MS软件：	MassLynx 4.2版
电离模式：	ESI+
采集模式：	MRM
毛细管电压：	0.5 kV
锥孔电压：	20 V
锥孔气流速：	50 L/h
脱溶剂气温度：	600 °C
脱溶剂气流速：	1000 L/h
离子源温度：	150 °C

化合物	MRM通道	碰撞能量 (eV)	保留时间 (min)
丙烯酰胺	72.05 > 55.10	12	2.69
丙烯酰胺	72.05 > 44.10	10	-
丙烯酰胺	72.05 > 27.15	10	-
丙烯酰胺d3	75.00 > 58.10	15	2.66

表1.MRM通道*

*使用选择性表现最佳的MRM通道。使用MassLynx MS软件（4.2版）采集数据，并用TargetLynx XS处理数据。利用Autodwell功能自动设置最佳驻留时间。

结果与讨论

通过评估各种色谱柱、流动相组成、梯度和MS通道进行LC-MS/MS方法优化。实验部分详细列出的条件是所测试的条件中总体性能最出色的。

根据欧盟委员会法规(EU) 2017/2158中的标准评估方法性能。验证结果表明，该方法测定各种代表性食品中丙烯酰胺的性能非常出色。说明该方法适用于检查许多食品是否符合法规(EU) 2158/2017中规定的基准浓度要求：薯片、面包、咖啡、婴儿饼干和婴儿食品（表2）。

	薯片	面包	咖啡	婴儿食品	婴儿饼干
基准浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	750	50	400	40	150
要求的LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	50	20	50	20	50
要求的LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	15	6.0	15	6.0	15

表2. 食品中丙烯酰胺的基准浓度以及相关的LOD和LOQ要求值

ACQUITY UPLC HSS C₁₈ SB色谱柱可为丙烯酰胺提供出色的保留性能和峰形。三官能团键合配体具有足够高的机械强度，该固定相可用于小粒径色谱柱填料（ $2\ \mu\text{m}$ ）中，从而有助于发挥超高效液相色谱(UPLC)在该应用中的优势，例如提高色谱分离度和缩短运行时间。图1显示了浓度为 $2\ \text{ng}/\text{mL}$ 的标准品水溶液（浓度相当于 $4\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 样品提取物）中丙烯酰胺的色谱图。

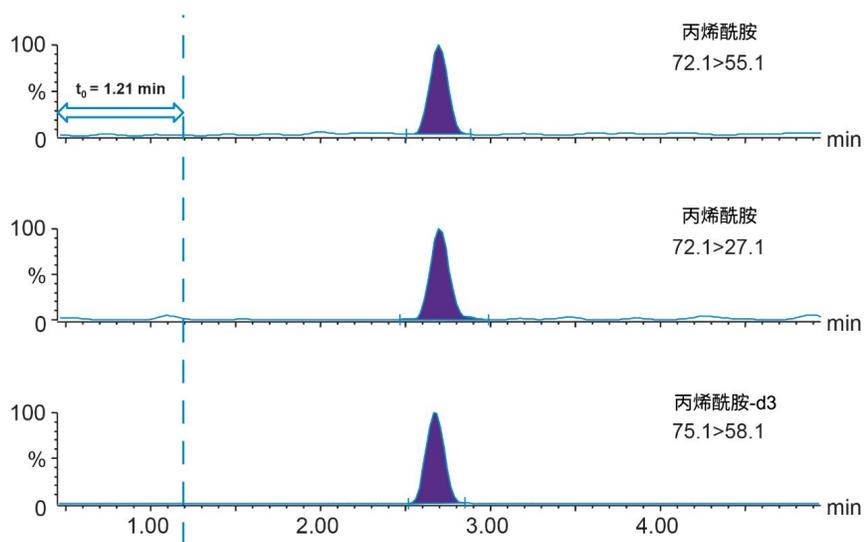


图1.2 ng/mL 丙烯酰胺水溶液（相当于样品萃取物中的浓度为 $4 \mu\text{g/kg}$ ）的色谱图

本实验在合适的浓度范围($0.5\sim 2500 \text{ ng/mL}$)内使用分段校准法对响应的线性进行了评估，结果如图2所示。由于难以找到不含丙烯酰胺的空白样品，因此未使用基质匹配曲线。利用丙烯酰胺-d3作为内标校正整个方法中的任何差异（包括任何LC-MS/MS基质效应）。决定系数($r^2 > 0.999$)和残差($< 10\%$)均非常出色。

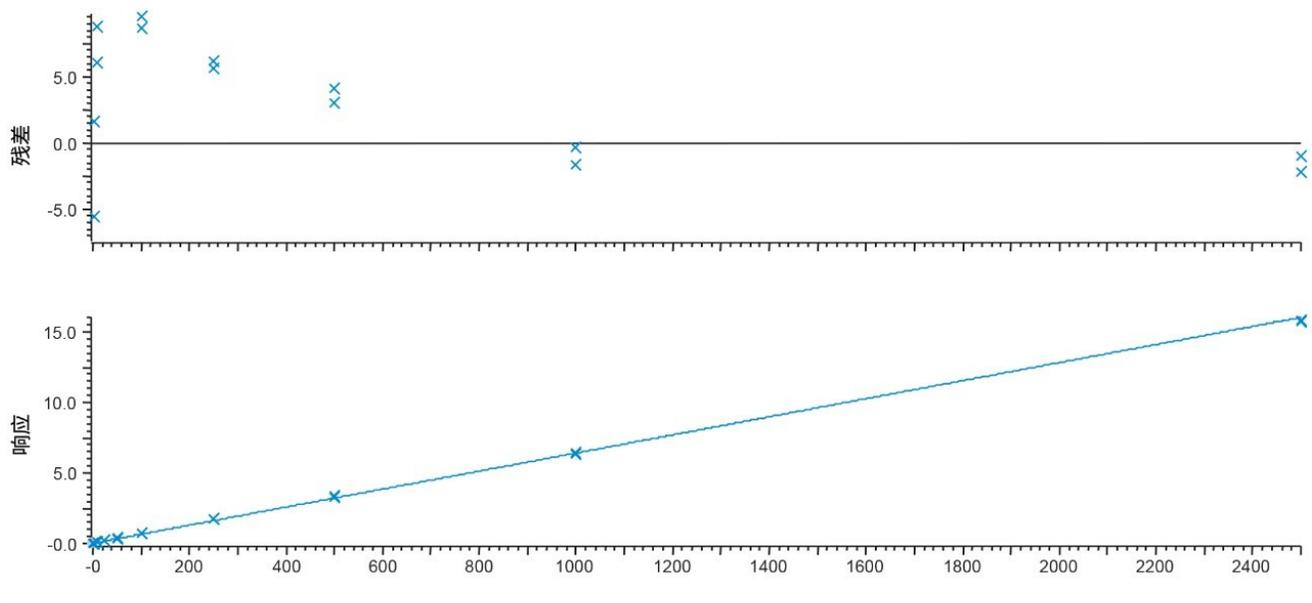


图2.丙烯酰胺水溶液的校准曲线（线性拟合， $1/x$ 加权）

图3所示为代表性商品样品中加标相关基准浓度后所得的丙烯酰胺检测结果（表1）。图4显示了按 $14\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 加标的婴儿饼干中丙烯酰胺的检测结果。该方法表现出优异的灵敏度和选择性，适用于检查样品是否符合根据欧盟基准浓度得出的LOD/LOQ要求。该应用解决方案还有望用于分析更低浓度的样品，这对于尽职调查检测非常有用。

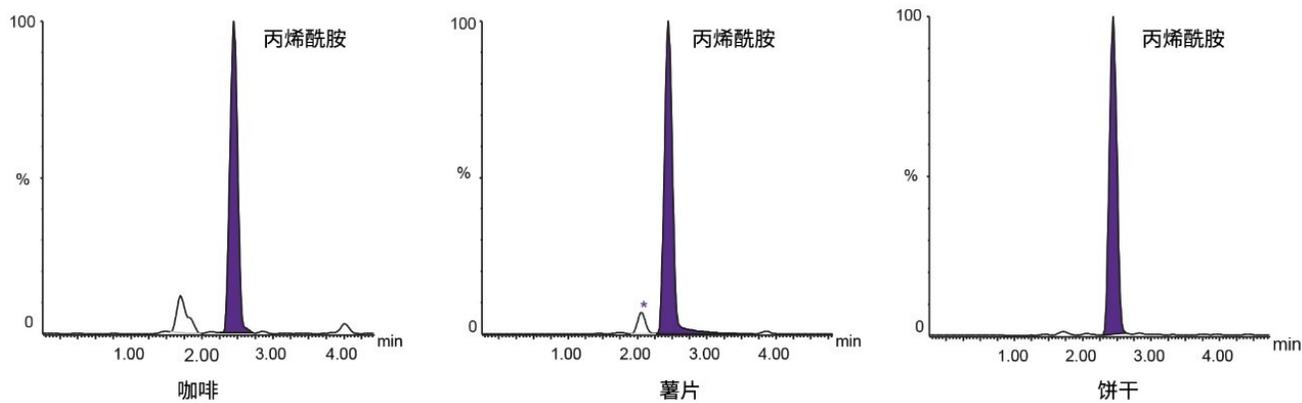


图3.按基准浓度加标的各种商品中丙烯酰胺的色谱图

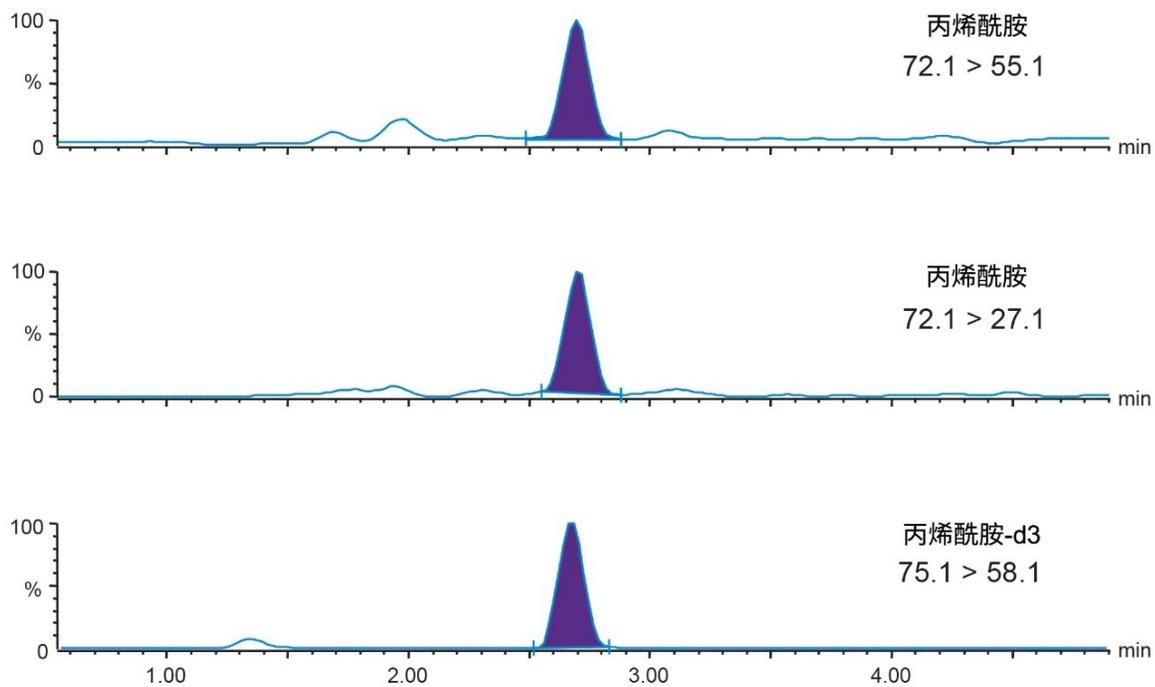


图4.按14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标的婴儿饼干中丙烯酰胺的检测色谱图

经证明，因为能够去除同分异构干扰物，快速净化方法即使对于薯片和咖啡等复杂基质也十分有效。图5显示了经过净化和未经净化的薯片样品的示例。此外，还可通过选择性更强的净化步骤（例如使用Oasis MCX进行SPE）去除复杂食品样品中的基质干扰组分。出色的灵敏度和选择性还有利于减少实验室用于提取的样品用量，从而有助于尽可能减小对LC-MS/MS系统的污染。

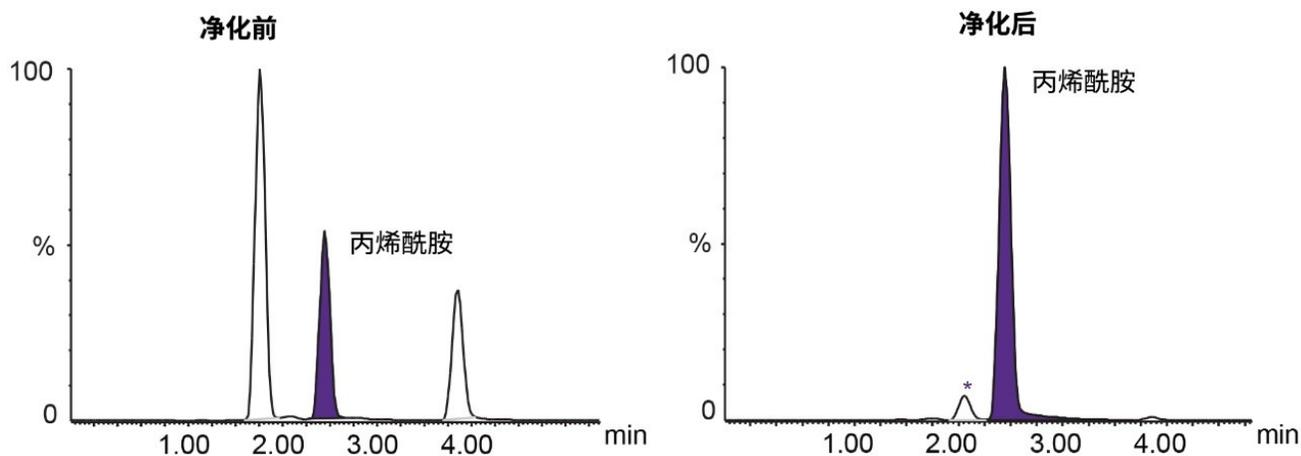


图5.净化前后对加标丙烯酰胺的薯片样品进行分析得到的色谱图

内部验证结果表明，该方法定量各种代表性食品中丙烯酰胺的性能非常出色（表3）。使用丙烯酰胺-d3作为内标时，该方法在两种加标浓度下均具有出色的准确度，符合性能标准；实测回收率在86%~107%的范围内（可接受标准75%~110%），重现性(RSDr)介于1.6%和5.5%之间。法规(EU) 2158/2017使用由Horwitz方程得出的值评估重现性。但Horwitz方程针对低于100 µg/kg的质量部分给出的值超出（高于）可接受范围，因此评估本方法重现性所采用的可接受标准相比其他情况（例如，≤20% RSD）更为严格⁶。利用本方法获得的%RSD明显低于SANTE可接受标准(<6%)，并且各种基质的结果一致。

	薯片	面包	咖啡	婴儿食品	婴儿饼干
低浓度加标					
回收率(%)	97	95	99	86	90
RSD (%)	4.6	1.8	4.4	1.6	3.3
高浓度加标					
回收率(%)	97	88	100	96	107
RSD (%)	5.5	2.2	4.0	3.8	4.3

表3.分析按两种浓度加标丙烯酰胺的代表性商品得到的实测回收率和重复性（每种浓度重复测定5次，经内标校正）

通过分析参考物质，进一步评估该分析方法的性能（图6）。分析FAPAS咖啡和薯片参考物质所得到的实测值与认定值一致，表现出良好的精密度（表4）。欧盟委员会法规(EU) 2158/2017不含任何可用于鉴定丙烯酰胺的标准

，但分析参考物质得到的离子丰度比和保留时间与加标样品所得到的参比值一致，并且均处于残留分析常用的偏差范围内（例如 $\leq 20\%$ 和 ± 0.1 min）⁶。

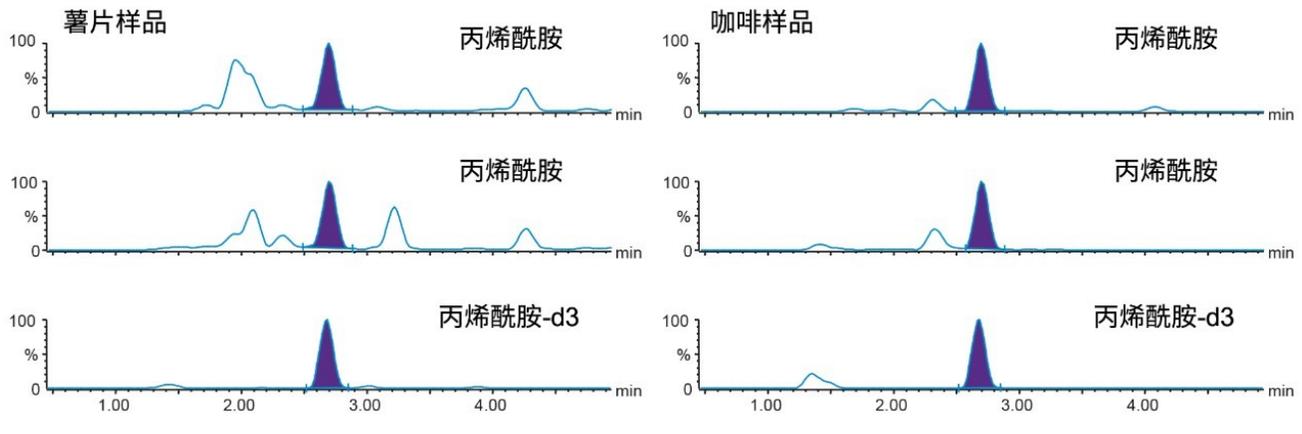


图6.分析已知包含丙烯酰胺的FAPAS测试样品得到的色谱图

	咖啡 (TYG010RM)	薯片 (TET043RM)
认定值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	249	625
实测值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	244	597
RSD (%)	4.6	3.0
偏差($\mu\text{g}/\text{kg}$)	-2.0%	-4.5%

表4.分析丙烯酰胺量已知的FAPAS测试样品得到的结果($n=9$)

结论

本研究的目的是评估ACQUITY UPLC I-Class系统与Xevo TQ-S micro联用法测定加工食品中丙烯酰胺的性能。内部验证结果表明，该方法在丙烯酰胺的检测、鉴定和定量分析中均具有出色的灵敏度。改良版QuEChERS方法能够有效提取和净化丙烯酰胺，可用于多种食品基质。基质参考标准品的分析结果表明，该方法具有良好的准确度、重现性、精密度和稳定性。Xevo TQ-S micro在线性和校准范围方面的性能堪称典范。在各种QC浓度下对该方法的正确度和精密度进行测定，均得到了优异的偏差和%RSD结果。

参考资料

1. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain).Scientific Opinion on acrylamide in food.*EFSA Journal*.2015; 13(6): 4104, 321 pp.doi:10.2903/j.efsa.2015.4104.
2. EFSA (European Food Safety Authority).Outcome of the Public Consultation on the Draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) on acrylamide in food.EFSA supporting publication 2015:EN-817:95.
3. Carere, A. Genotoxicity and Carcinogenicity of Acrylamide: a Critical Review.*Ann Ist Super Sanita*, 42, 2: 144-155.
4. Food Standards Agency.Food Survey Information Sheet.[online] 请访问：<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/Acrylamide%20and%20Furan%20FSIS%202017.pdf>. [Accessed 3 Oct. 2018].
5. EU Commission Regulation 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food.(Online) <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=EN>.Accessed 3 Oct. 2018.
6. European Union (2017).Document No.SANTE 11813/2017.Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed (Online).https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf.Accessed 3 Oct. 2018.

特色产品

Xevo TQ-S micro <<https://www.waters.com/134798856>>

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720006495ZH, 2020年11月修订

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.