

丙烯酰胺的测定：能否绕过同分异构干扰物？

Janitha De-Alwis, Euan Ross, Stuart Adams

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

欧盟(EU)立法（欧盟委员会法规(EU) 2017/2158）规定了加工食品中丙烯酰胺的基准浓度，食品生产商有责任制定缓解措施以应对超过基准浓度的情况。沃特世将快速、有效的提取和净化手段与LC-MS/MS测定结合使用，开发出一种准确、耐用的丙烯酰胺分析方法。针对最近报道的关于N-乙酰基-β-丙氨酸、3-氨基丙酰胺和乳酰胺可能导致过高估计食品中丙烯酰胺含量的问题，我们对方法的选择性开展了进一步研究。研究确认，这三种化合物会发生源内碎裂，产生与丙烯酰胺具有相同 m/z 的离子，随后碎裂为丙烯酰胺测定所用的子离子。对样品净化的研究表明，这些化合物没有从样品提取物中去除，如果未实现色谱分离，将会干扰丙烯酰胺的测定。这三种干扰化合物均使用之前发表的LC方法进行色谱分离。该方法已使用FAPAS参比物质进行验证，所得结果与标准值高度吻合。可参见有关FAPAS参比物质的原始应用纪要，其中的结果与标准值高度吻合。

优势

- 使用快速、准确、精密且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
- 使潜在干扰物N-乙酰基-β-丙氨酸、3-氨基丙酰胺和乳酰胺与丙烯酰胺实现色谱分离

简介

丙烯酰胺是一种强极性水溶性化合物，在食品生产过程中经高温(+120°C)烹饪产生，发生的主要化学反应称为美拉德反应¹。食品中的丙烯酰胺含量之所以引人关注，是因为该物质具有神经毒性、遗传毒性、致癌性和生殖毒性等毒理学特性¹。由于丙烯酰胺广泛存在于日常食品中，因此使用准确、耐用的方法对低浓度丙烯酰胺进行检测和定量至关重要。EU法规2017/2158规定了缓解措施和基准浓度，旨在减少食品中的丙烯酰胺含量²。

我们测定复杂食品基质（例如薯片和咖啡）中丙烯酰胺的新版解决方案采用经过改良的QuEChERS提取步骤，其包括两种净化选项：分散固相萃取(dSPE)或Oasis MCX通过式SPE（用于增强型净化），然后使用ACQUITY UPLC HSS C₁₈ SB色谱柱进行LC-MS/MS分析³。

最近有一项研究发现，在各种食品基质（例如咖啡）中，还存在可能干扰丙烯酰胺定量的其他化合物⁴。我们研究了潜在的丙烯酰胺同分异构体杂质，并将N-乙酰基-β-丙氨酸的源内碎片鉴定为主要的同分异构体离子。3-氨基丙酰胺和乳酰胺是其他一些有待报告的干扰物。虽然我们的方法在验证过程中已经过严格的测试，但鉴于近期发现了可能存在的同分异构干扰物，我们对方法的选择性进行了重新研究。

结果与讨论

开展本研究的目的是，基于这些新信息，确保沃特世丙烯酰胺试剂盒不会过高估计丙烯酰胺残留量。研究从三个方面入手：这些化合物产生的母子离子对是否与丙烯酰胺所用的母子离子对同量异位；样品净化方案是否去除这些化合物；使用沃特世应用纪要720006495EN <

https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006495_an_acrylamide.pdf> 中发布的条件是否使潜在的干扰物得到色谱分离。

利用溶剂标准品通过RADAR扫描对三种化合物的潜在源内碎裂进行研究。RADAR是一种可以同时采集MRM和全扫描MS且性能不会发生任何明显下降的采集模式，这种独特功能可简化并加快方法开发。RADAR是所有Xevo串联四极质谱仪系统的一项标准功能。这些扫描结果（图1）确认，当使用丙烯酰胺分析方法的MS参数时，化合物的确在源内产生*m/z* 72的离子。随后使用*m/z* 72作为母离子对N-乙酰基-β-丙氨酸、3-氨基丙酰胺和乳酰胺进行子离子扫描，确认在*m/z* 55和27处形成子离子。因此，这些化合物可能会干扰丙烯酰胺检测所用的两个母子离子对（*m/z* 72>55和72>27），导致过高估计丙烯酰胺的浓度。

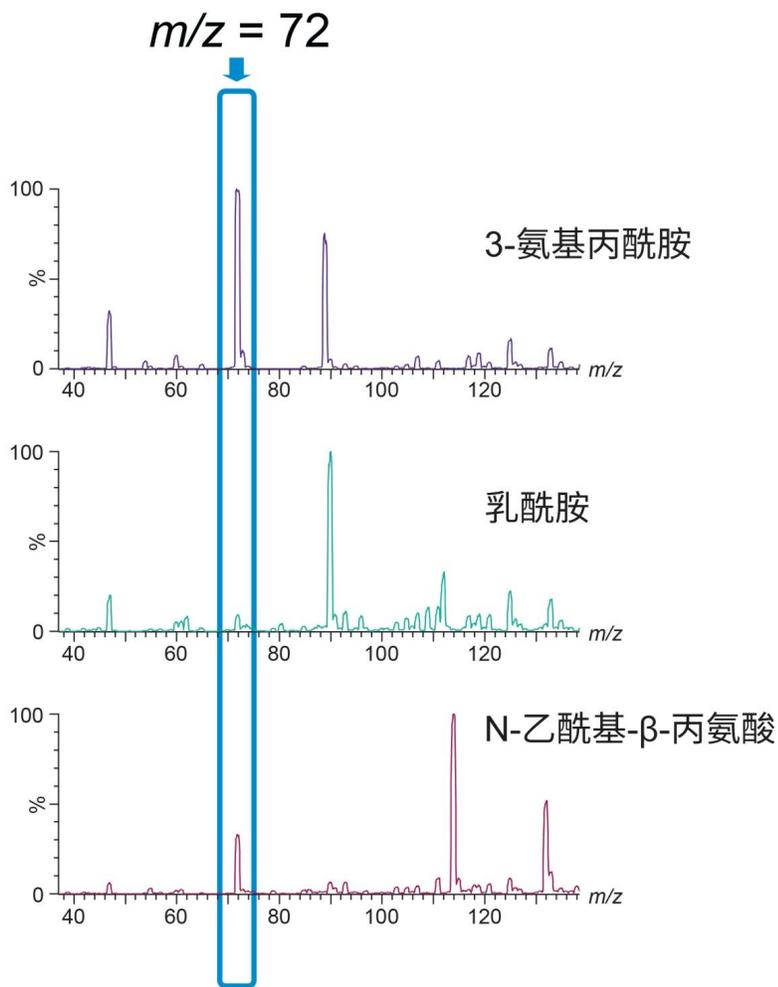


图1.在RADAR采集模式下获得的乳酰胺、3-氨基丙酰胺和N-乙酰基-β-丙氨酸的质谱图

我们使用发布的LC条件研究两种净化选项能否成功去除潜在干扰物，以及这些化合物是否与丙烯酰胺共流出。初步研究结果见图2所示的色谱图，结果表明，这些化合物在净化后并未从提取物中完全去除，因此必须进行色谱分离。图3显示，在以前发布的条件下使用ACQUITY HSS C₁₈ SB色谱柱和pH受控的流动相时，N-乙酰基-β-丙氨酸、3-氨基丙酰胺和乳酰胺均与丙烯酰胺峰实现完全分离。移除流动相A中的甲酸后(pH=7)，丙烯酰胺和乳酰胺峰的保留时间不受影响，分别保持在2.90 min和1.90 min处。但是，N-乙酰基-β-丙氨酸峰从2.95 min偏移至2 min，同时3-氨基丙酰胺未得到保留（图4）。由此表明，如果不控制流动相的pH，N-乙酰基-β-丙氨酸将可能与丙烯酰胺共流出。

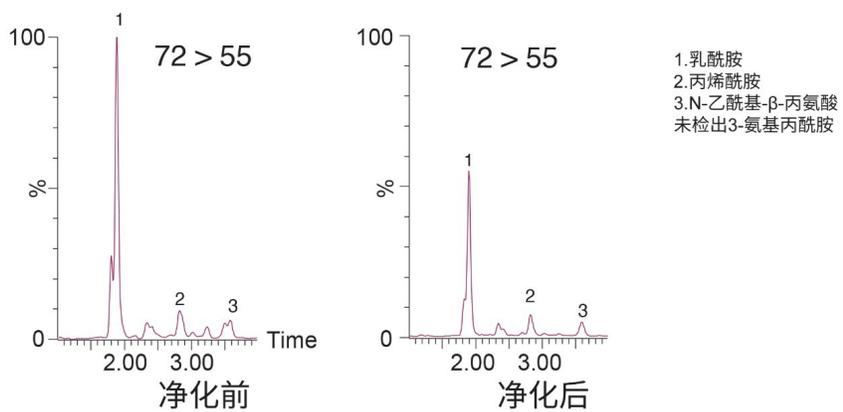


图2.咖啡提取物经Oasis MCX净化前后得到的色谱图

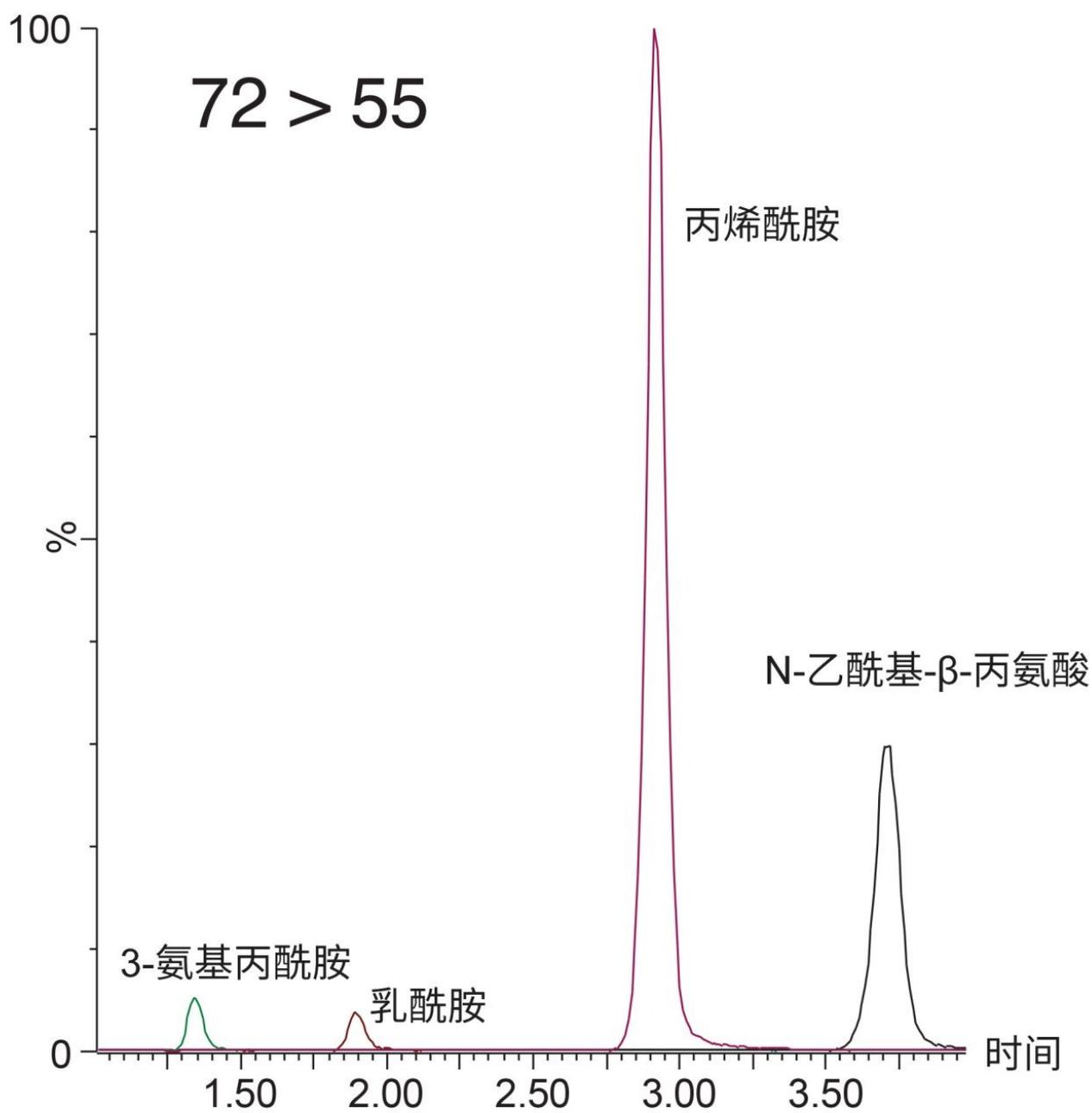


图3.利用当前的沃特世方法得到的3-氨基丙酰胺、乳酰胺、丙烯酰胺和N-A-β-丙氨酸的色谱分离结果
流动相A: 0.1%甲酸的水溶液, B: 甲醇

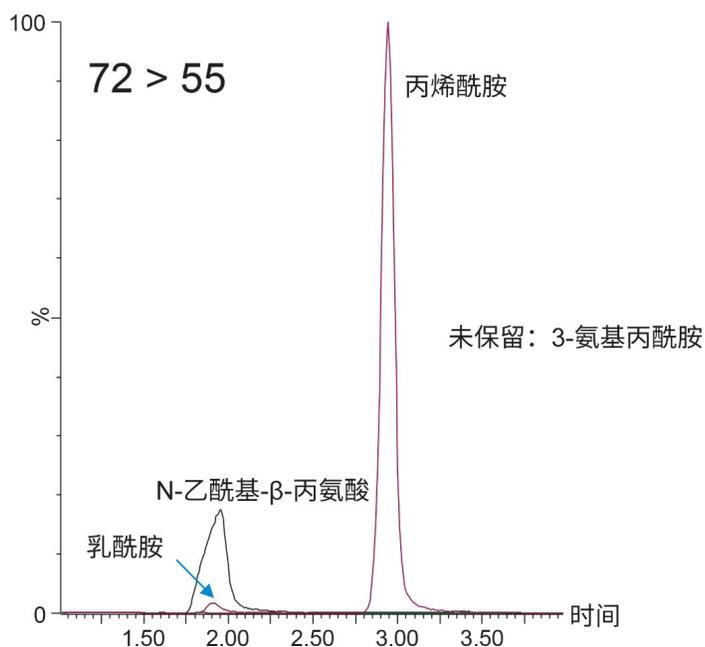


图4.使用改性流动相得到的3-氨基丙酰胺、乳酰胺、丙烯酰胺和N-A-β-丙氨酸的色谱分离结果

流动相A: 水, B: 甲醇

为确认使用沃特世丙烯酰胺试剂盒不会过高估计丙烯酰胺残留量，本研究分析了购自FAPAS（参比：TYG010RM）的咖啡参比物质。使用dSPE ($x_{\text{d}}=248 \mu\text{g}/\text{kg}$)和Oasis MCX SPE净化($x_{\text{d}}=250 \mu\text{g}/\text{kg}$)获得的结果与认定值 $249 \mu\text{g}/\text{kg}$ 高度吻合。结果表明，在存在其他化合物的情况下，通过分析参比物质，色谱图中的丙烯酰胺峰可以得到正确归属。在优化的pH条件下使用ACQUITY HSS C₁₈ SB色谱柱的方法具有优异的选择性，能够实现丙烯酰胺的准确定量。分析参比物质得到的离子丰度比和保留时间与分析加标样品得到的参比值一致，均处于残留物分析常用的偏差范围内（例如 $\leq 20\%$ 和 $\pm 0.1 \text{ min}$ ）。

结论

即使存在N-乙酰基-β-丙氨酸、3-氨基丙酰胺和乳酰胺，丙烯酰胺试剂盒方法也可以准确测量FAPAS参比物质中的丙烯酰胺。关键参数是控制水性流动相的pH，确保三种潜在干扰物与丙烯酰胺分离。

参考文献

1. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2015. Scientific Opinion on Acrylamide in Food. *EFSA Journal* 2015;13(6):4104, 321 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4104.
2. COMMISSION REGULATION (EU) 2017/2158 of 20 November 2017 Establishing Mitigation Measures and Benchmark Levels for the Reduction of the Presence of Acrylamide in Food. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R2158&from=EN> [Accessed 22 Jul. 2020].
3. Determination of Acrylamide in Processed Foods using ACQUITY UPLC I-Class and Xevo TQ-S micro. (2019) Waters Corporation (p/n: 720006495 <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006495_an_acrylamide.pdf>). (Accessed online 22 July 2020).
4. Desmarchelier, A, Hamel, J, Delatour, T. 2020. Source of Overestimation in the Analysis of Acrylamide in Coffee by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1610(460566).

特色产品

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

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

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

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007009ZH, 2020年9月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.