

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定客家娘酒中的2-甲基咪唑、4-甲基咪唑及5-羟甲基糠醛

王彬滢¹, 戴尽波², 刘 垚^{1*}

(1. 珠海科技学院药学与食品科学学院, 珠海 519040; 2. 梅州市食品药品监督管理局, 梅州 514000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法同时测定客家娘酒中的2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 2-MEI)、4-甲基咪唑(4-methylimidazole, 4-MEI)和5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)的分析方法。**方法** 样品经过直接稀释法和标准加入法分别进行前处理, 使用 ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱进行样品分离, 以甲醇-5 mmol/L 氨水为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾离子源正离子模式和多反应监测模式进行检测。**结果** 在优化条件下, 2-MEI 和 4-MEI 在 1~500 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)为 0.9998 和 0.9998, 5-HMF 在 50~8000 ng/mL 线性范围内 r^2 为 0.9970。2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 在低、中、高 3 个浓度添加水平下的回收率范围分别为 88.7%~108.0%、77.5%~102.0%和 95.7%~98.4%, 相对标准偏差分别为 4.16%~10.50%、2.04%~5.49%和 3.10%~6.62%。2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 的检出限分别为 3、3 和 17 ng/mL, 定量限分别为 10、10 和 50 ng/mL。**结论** 本方法操作简便、线性关系良好、回收率高, 适用于客家娘酒中 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 的检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 客家娘酒; 2-甲基咪唑; 4-甲基咪唑; 5-羟甲基糠醛

Simultaneous determination of 2-methylimidazole, 4-methylimidazole and 5-hydroxymethylfurfural in Hakka rice wine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Bin-Ying¹, DAI Jin-Bo², LIU Yao^{1*}

(1. School of Pharmacy and Food Science, Zhuhai College of Science and Technology, Zhuhai 519040, China;
2. Meizhou Institute for Food and Drug Control, Meizhou 514000, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for simultaneous determination of 2-methylimidazole (2-MEI), 4-methylimidazole (4-MEI) and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Hakka rice wine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were pretreated by direct dilution method and standard addition method, respectively, ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) chromatographic column was used for sample separation, methanol-5 mmol/L ammonia was used as the mobile phase for gradient elution, electrospray ion source positive ion mode and multiple reaction monitoring mode were used for detection. **Results** Under the optimal conditions, the linear relationships of 2-MEI and 4-MEI were good in the range of 1–500 ng/mL, the

基金项目: 吉林大学珠海学院创新培育工程项目(2019XJCQ006)

Fund: Supported by the Innovation and Cultivation Program of Zhuhai College of Jilin University (2019XJCQ006)

*通信作者: 刘垚, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品加工工艺和食品安全检测技术。E-mail: 87536189@qq.com

*Corresponding author: LIU Yao, Master, Senior Engineer, School of Pharmacy and Food Science, Zhuhai College of Science and Technology, No.8, Anji East Road, Jinwan District, Zhuhai 519040, China. E-mail: 87536189@qq.com

correlation coefficients (r^2) were 0.9998 and 0.9998, and the linear range of 5-HMF was 50-8000 ng/mL, r^2 was 0.9970. The recovery ranges of 2-MEI, 4-MEI and 5-HMF were 88.7%-108.0%, 77.5%-102.0% and 95.7%-98.4% at the low, medium and high levels, respectively, with relative standard deviations of 4.16%-10.50%, 2.04%-5.49% and 3.10%-6.62%, respectively. The limits of detection for 2-MEI, 4-MEI, and 5-HMF were 3, 3, and 17 ng/mL, respectively, and the quantitation limits were 10, 10, and 50 ng/mL, respectively. **Conclusion** This method is simple, with good linear relationship and high recovery rate, and is suitable for the determination of 2-MEI, 4-MEI and 5-HMF in Hakka rice wine.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Hakka rice wine; 2-methylimidazole; 4-methylimidazole; 5-hydroxymethylfurfural

0 引言

客家娘酒是一种以糯米和酒饼为原料酿造而成的米酒,也被称为客家黄酒、月子酒,是我国华南地区和东南地区客家人聚集区域的标志性食品之一^[1]。客家娘酒醇厚香甜、气香味浓,且含有 γ -氨基丁酸、生物活性肽、多酚类和低聚糖等多种营养成分^[2-5],是客家人在逢年过节、添丁升学、乔迁寿宴等重要场合必备的酒类。客家娘酒的酿造流程大致分为“选料-浸泡-蒸米-冷却-拌入酒曲-发酵-接酿-炙酒-封坛-陈酿”10个阶段。“炙酒”过程中的“炙沸”阶段是利用稻草的燃烧产生的猛火将瓮中的酒液煮沸,从而达到杀菌驱寒的效果^[6]。由于娘酒中含有大量还原糖和氨基酸,两者会在高温下发生美拉德反应,在生成能够使娘酒具有特殊风味物质的同时还会生成醛、酮和含氧、氮或硫的杂环化合物,如 2-甲基咪唑(2-methylimidazole, 2-MEI)、4-甲基咪唑(4-methylimidazole, 4-MEI)、5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF)等^[7]。

4-MEI 具有较强的惊厥作用,能够使兔子、老鼠等多种动物处于高度兴奋状态^[8]。国际肿瘤研究中心(the International Agency for Research on Cancer, IARC)发布的致癌物列表名单中,2-MEI 和 4-MEI 被列为 2B 级致癌物(group 2B)^[9]。欧洲联盟食品安全局和我国 GB 1886.64—2015《食品安全国家标准 食品添加剂焦糖色》均明确规定了焦糖色素中 4-MEI 的含量应低于 200 mg/kg^[10]。欧洲食品安全局基于修正理论最大日添加量法(modified theoretical added maximum daily intake, mTAMDI),确定 5-HMF 每日摄入最大限度为 1.6 mg^[11]。过量摄入 5-HMF 会伤害机体横纹肌及内脏^[12]。

目前检测食品中 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 的方法有液相色谱法^[13-14]、气相色谱法^[15-16]、气相色谱-质谱法^[17]、高效液相色谱-串联质谱法^[18-20]、酶联免疫法^[21-22]、拉曼光谱法^[23]、胶束电动力学法^[24-25]、毛细管电泳法^[26-28]、分光光度法^[29-30]等。液相色谱法灵敏度较低,无法满足痕量分析需求;气相色谱法需要柱前衍生化,操作烦琐;酶联免疫法容易受杂质干扰而产生假阳性;分光光度法的前处

理复杂;拉曼光谱法和胶束电动力学法的普及度较低。而液相色谱-串联质谱法集液相色谱的高效分离能力和质谱的高选择性、高灵敏度、高鉴别能力,不仅能够对化合物进行结构鉴定,还能够准确定性定量分析,从而缩短检测时间,达到高通量检测的目的。因此,液相色谱-串联质谱法被广泛应用于食品中有毒有害或低含量物质的分析检测。对于检测食品中的 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF,文献多报道于检测焦糖色素、酱油、饮料等食品,目前针对客家娘酒中这 3 种化合物的检测较为少见。

本研究建立了定量、准确、简便的超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时测定客家娘酒中的 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF,使用直接稀释法和标准加入法对样品进行前处理,优化色谱质谱条件,以填补客家娘酒中甲基咪唑类和咪唑类化合物检测的空白,为以后相关部门加大对食品质量安全的监管及风险评估和限值制定提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

2-MEI、4-MEI、4-MEI-D₆ 和 5-HMF 标准品(纯度均大于等于 98%,北京曼哈格生物科技有限公司);甲醇(色谱纯,美国 ACS 恩科化学公司);甲酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);实验用水为超纯水。

本实验所用的客家娘酒样品从当地市场购买。

1.2 仪器与设备

Nexera XR 超高效液相色谱仪、AUW220 型电子天平(日本岛津公司);Triple Quad™ 3500 三重四极杆串联质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Turbo V 电喷雾离子源(美国安捷伦有限公司);Thermo ST16R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);UC-7100S 型数控超声波清洗器(美国美瑞泰克科技有限公司);S25 旋涡混匀器(德国 IKA 公司);Milli Q 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3 超高效液相色谱-串联质谱法检测条件

1.3.1 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为甲醇, B 为 5 mmol/L 氨水; 梯度洗脱程序: 0.0~1.0 min, 10% A; 1.0~4.5 min, 10%~40% A; 4.5~4.6 min, 40%~10% A; 4.6~6 min, 10% A; 流速 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5 μL。

1.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI); 扫描方式: 正离子模式; 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 离子源参数: 电离电压: +5500/-4500 V; 气帘气: 30 psi; 雾化气: 50 psi; 辅助气: 60 psi; 源温度: 550 °C; 碰撞气: 7 psi。优化后的质谱条件参数如表 1 所示。

1.4 标准溶液配制

1.4.1 甲酸水配制

0.2%甲酸水溶液: 准确量取 2 mL 甲酸, 加入至 998 mL 水中, 混匀。

1.4.2 标准储备液

准确称取 2-MEI、4-MEI、5-HMF 各 10 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的标准溶液, 置于 0~4 °C 下避光贮存, 有效期为 1 年。

1.4.3 内标储备液

准确称量 4-MEI-D₆ 10 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的内标溶液, 置于 0~4 °C 避光保存, 有效期 1 年。

1.4.4 混合标准中间溶液

1 mg/mL 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 标准储备液分别准确移取 0.050 mL 至 50 mL 容量瓶, 用甲醇溶液定容至 50 mL, 配制成 1 μg/mL 的混合标准中间溶液, 置于 0~4 °C 避光贮存。

1.4.5 氘代 4-MEI 标准中间溶液

准确移取 1 mg/mL 氘代 4-MEI 内标储备溶液 0.050 mL 至 50 mL 容量瓶, 用甲醇溶液定容至 50 mL, 配制成 1 μg/mL 的氘代 4-MEI 标准中间溶液, 置于 0~4 °C 避光贮存, 有效期为 6 个月。

1.4.6 混合标准使用溶液

根据实验需求, 临时吸取一定的混合标准中间溶液和内标标准中间溶液, 用空白基质稀释配制成适当浓度的混合标准使用溶液, 每毫升混合标准工作溶液中含有 4-MEI-D₆ 为 100 ng。

1.5 样品前处理

1.5.1 检测 2-MEI 和 4-MEI 前处理(直接稀释法)

市场购买的所有样品均在室温下保存。取样品 100 μL 于 1.5 mL 离心管中, 随后加入 100 μL 1 μg/mL 同位素内标工作溶液进行加标, 再加入 800 μL 去离子水进行稀释, 涡旋混匀, 8000 r/min 离心 3 min 后, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 随后进行 UPLC-MS/MS 分析。

1.5.2 检测 5-HMF 前处理(标准加入法)

由于样品中均含有 5-HMF, 无法找到空白样品进行加标实验, 因此采用标准加入法进行前处理。

分两个连续步骤进行: (1)用纯水绘制标准曲线, 确定方法线性范围; (2)将样品用水稀释 50 倍并进行分析, 计算出 5-HMF 的大概浓度, 以确定下一步标准添加浓度范围。

标准加入法的具体操作: (1)分别吸取 900 μL 样品溶液至五支离心管中; (2)在每支离心管中分别加入质量浓度为 0.0、0.1、0.2、0.5、1.0 μg/mL 的 5-HMF 标准溶液 100 μL; (3)过 0.22 μm 膜, 分别进行 UPLC-MS/MS 分析; (4)以 5-HMF 浓度为横坐标(X , μg/mL), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 并检查线性($r^2 > 0.99$)。通过延伸标准曲线, 与 5-HMF 标准溶液浓度轴相交得到的截距绝对值即为样品溶液中 5-HMF 的含量。

表 1 质谱条件参数
Table 1 Mass spectrometry condition parameters

化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞电压/V
2-MEI	2.71	83.1	42.1*	80	24
			56.1	80	35
			56.1*	80	35
4-MEI	1.74	83.1	42.1	80	24
			60	75	35
4-MEI-D ₆	1.74	88.1	109*	60	15
5-HMF	1.06	127.0	81	60	22

注: *为定量离子。

2 结果与分析

2.1 前处理条件的选择

黄酒中富含氨基酸、葡萄糖和多酚等多种易干扰的成分,且目标化合物的极性较大,因此,样品前处理是关键也是难点^[31]。目前,UPLC-MS/MS的样品前处理方法主要有固相萃取^[32-33]、QuEChERS^[34-35]、超临界流体萃取^[36]等。虽然采用上述方法可以减少一定的干扰,但增加了成本与时间。为使样品前处理更简便、快速,本研究采用直接稀释法进行甲基咪唑检测前处理^[37],该方法具有简化样品前处理步骤和极大缩短检测时间的优点;样品中均含有5-HMF而无法进行加标实验,因此,在没有理想的空白基质下,采用标准加入法进行5-HMF检测前处理,同时可以补偿基质效应^[38]。

2.2 质谱参数优化

从图1的3种化合物结构式可知,2-MEI和4-MEI均含有2个N原子,即分别含有一个氨基基团,容易获得H⁺,形成分子离子峰[M+H]⁺;5-HMF含有一个羟基。针对5-HMF,蔡玮红等^[7]经过实验对比,认为5-HMF在ESI⁺模式下,其一级质谱的响应强度大于在ESI⁻模式下大约2个数量级,因此采用ESI⁺模式。本研究为进一步确认电离模式,根据其化学结构,初步探索ESI正电离子模式。配制1 μg/mL混合标准溶液,注入质谱,3种化合物进行正负模式比较。结果显示正模式下的一阶质谱响应强度比负模式的高出两倍,故最终采用正离子模式。在一级质谱扫描中,优化了锥孔电压及毛细管电压等参数,使得母离子的响应值达到最大。二级质谱扫描时,碰撞气和电压可以破坏或重排化合物,从而生成不同的特征碎片离子。对于2-MEI, m/z 83.1→42.1的响应值较大;4-MEI是 m/z 83.1→56.1的响应值较大;5-HMF则是 m/z 127→109的响应值较大。因此,将强度高的离子作为定量离子,则2-MEI、4-MEI和5-HMF的定量离子分别为 m/z 42.1、 m/z 56.1和 m/z 109,采用MRM模式对最佳锥孔电压、碰撞能量等参数进行优化,从而获得目标分析物的最佳响应。2-MEI、4-MEI、4-MEI-D₆和5-HMF优化后的质谱条件参数详见表1。

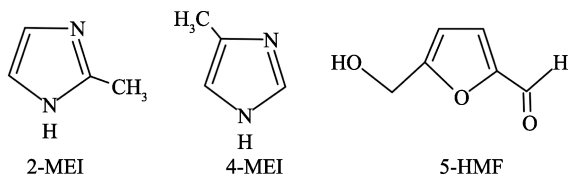


图1 3种化合物的化学结构式

Fig.1 Chemical structures of 3 kinds of compounds

2.3 色谱参数优化

2.3.1 色谱柱的选择

2-MEI和4-MEI是同分异构体,且MS/MS质谱表明两种化合物的碎片离子是相同的,即拥有相同的母离子和产物离子,而质谱无法鉴别,只能使用色谱柱才能完全分离并进行检测,因此选择色谱柱是关键。本研究考察对比了Atlantis T3、BEH HILIC、Kinetex F5、XTERRA MS C₁₈ 4种色谱柱对2-MEI、4-MEI和5-HMF的分离情况,如图2所示。BEH HILIC色谱柱能完全分离目标物且展现出较好的峰型和灵敏度。Atlantis T3色谱柱也能完全分离化合物,但峰型出现显著的拖尾。Kinetex F5色谱柱和XTERRA MS C₁₈色谱柱均出现分离不完全的现象,分离效果较差。甲基咪唑的极性较大,而HILIC色谱分离恰好能保留极性较大的分子,且使用的流动相比较简单,能与质谱有良好的相互兼容。因此,选择最优的BEH HILIC色谱柱对本实验的样品进行分离测定。

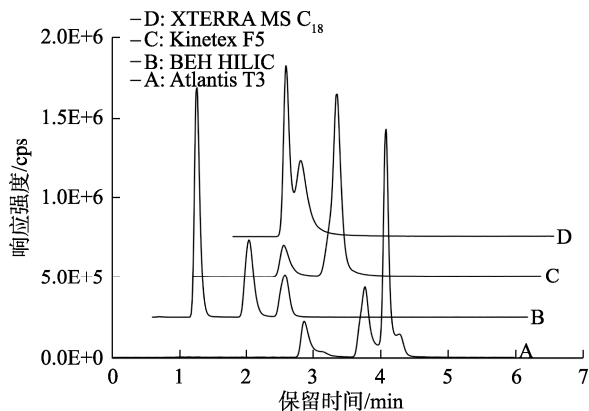


图2 2-MEI、4-MEI和5-HMF在4种色谱柱上的分离效果

Fig.2 Separation effects of 2-MEI, 4-MEI and 5-HMF on 4 kinds of chromatographic columns

2.3.2 流动相的选择

甲醇和乙腈是UPLC常用的有机相,本研究选用并分别考察两者作为流动相时化合物的响应强度。结果显示,甲醇和乙腈都能够很好地分离目标化合物。使用甲醇时干扰影响较小,但使用乙腈时,恰恰相反。经推论,其原因可能是在ESI⁺模式下,乙腈获得H⁺形成离子峰[M+H]⁺,生成了 m/z 42的碎片离子。该 m/z 与2-MEI的 m/z 相同,这对2-MEI的检测有强烈影响。因此,选择甲醇作为本研究的有机相。

另外,本研究考察了目标化合物分别在3种不同的流动相体系甲醇-水、甲醇-0.2%甲酸水和甲醇-5 mmol/L氨水中的响应强度。结果如图3所示,甲醇-水体系和甲醇-0.2%甲酸水体系均出现分离不完全的现象,而甲醇-5 mmol/L氨水的峰型尖锐且有较好的分离度。因此,选择甲醇-5 mmol/L氨水作为本研究的流动相体系。

最后, 考察了不同浓度的氨水作为色谱流动相的水相时化合物的响应情况。选择 2.5、5.0、10.0 mmol/L 3 种浓度的氨水进行实验, 结果如图 4 所示。浓度为 2.5 mmol/L 和 10.0 mmol/L 的氨水作为流动相时, 峰型呈现拖尾和色谱峰展宽现象, 5.0 mmol/L 氨水呈现了良好的峰型和分离度。因此, 选用 5.0 mmol/L 氨水作为流动相的水相。综上所述, 以 5.0 mmol/L 氨水为 A 相, 甲醇为 B 相, 使用梯度洗脱程序, 检测 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 3 种目标化合物。

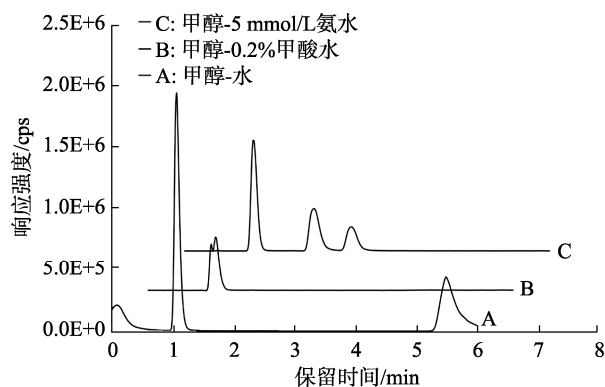


图 3 3 种不同流动相的分离效果

Fig.3 Separation effects of 3 kinds of different mobile phases

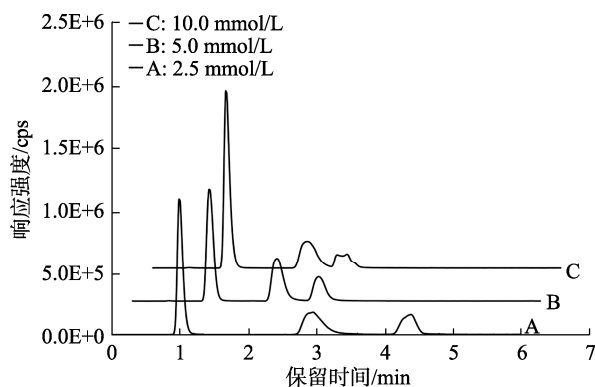


图 4 3 种不同浓度氨水的分离效果

Fig.4 Separation effects of 3 kinds of different concentrations of ammonia water

2.4 方法学验证

2.4.1 基质效应

除目标化合物外, 样品中的其他成分在一定程度上干扰了待测物的分析, 影响了检测的灵敏度和准确度, 这一系列的影响即为基质效应(matrix effect, ME)。本研究通过空白加入法来考察基质效应, 取空白样品按前处理步骤制备空白基质液, 然后用空白基质液、纯溶剂甲醇分别配制标准溶液, 将所得的两条曲线斜率按公式(1)计算即可得到绝对基质效应:

$$ME = \frac{S_m}{S_s} \times 100\% \quad (1)$$

S_m 为基质配制标准溶液的校准曲线的斜率, S_s 为纯溶剂配制标准溶液的校准曲线的斜率。若 $ME < 100\%$ 时, 说明基质对化合物有抑制效应; 若 $ME > 100\%$, 说明基质对化合物有增强效应。

2-MEI 的基质标准曲线与溶剂标准曲线斜率分别为 0.0097 和 0.0116, 通过公式(1)的计算可得出 2-MEI 的基质效应为 84%; 4-MEI 的基质标准曲线与溶剂标准曲线斜率分别为 0.0103 和 0.0143, 通过公式(1)的计算得出 4-MEI 的基质效应为 72%, 均表明客家娘酒样品中的基质对目标分析物有抑制效应。为消除基质效应影响, 本研究采取基质标准曲线进行定量检测, 因 5-HMF 采用标准加入法, 已达到消除基质干扰目的, 不进行基质效应研究。

2.4.2 线性关系、检出限与定量限

本研究将标准工作溶液用空白基质液逐级稀释得到 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、500.0 ng/mL 的混合标准溶液, 其中每毫升混合标准工作溶液中含有 4-MEI- D_6 100 ng。按照优化条件进行检测, 以混合标准溶液的质量浓度(X , ng/mL)为横坐标, 以目标物与其内标物定量离子峰面积的面积比为纵坐标(Y), 进行线性回归分析。结果如表 2 所示。在信噪比(S/N)为 3 时, 确定 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 的检出限分别为 3、3 和 17 ng/mL; 当信噪比(S/N)为 10 时, 确定 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 的定量限分别为 10、10 和 50 ng/mL。

表 2 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 的线性范围、线性方程和相关系数

Table 2 Linear ranges, linear equations and correlation coefficients of 2-MEI, 4-MEI and 5-HMF

分析物	线性范围/(ng/mL)	线性方程	相关系数 (r^2)
2-MEI	1~500	$Y=0.0097X+0.0472$	0.9998
4-MEI	1~500	$Y=0.0103X+0.0034$	0.9998
5-HMF	50~8000	$Y=4 \times 10^6 X + 654113$	0.9970

2.4.3 回收率和精密度

取客家娘酒样品分别添加低、中、高 3 个加标浓度水平, 每个加标水平平行测定 6 次, 计算各分析物的平均回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。根据本研究建立的方法进行检测, 结果详见表 3, 2-MEI、4-MEI 和 5-HMF 在低、中、高 3 个浓度添加水平下的回收率范围分别为 88.7%~108.0%、77.5%~102.0% 和 95.7%~98.4%, 相对标准偏差分别为 4.16%~10.50%、2.04%~5.49% 和 3.10%~6.62%。由此可看出, 该方法具有良好的准确度和精密度, 可以用于实际样品的检测。

2.5 实际样品检测

采用本研究建立的方法检测 11 种市售的客家娘酒中

2-MEI、4-MEI和5-HMF的含量。其中,11个样品均未检测出2-MEI,而4-MEI和5-HMF的结果均有较大差异。对于4-MEI,有8个样品未检测出;另外3个样品中4-MEI含量分别为9.74、13.72和27.85 ng/mL。11个样品均检测出5-HMF,含量为30~1735 $\mu\text{g/mL}$,5-HMF含量最大值相较于最小值高达58倍,有显著差异。本研究检

测的所有样品中的4-MEI含量均低于国家标准规定的最大限量200 mg/kg,均符合标准要求。目前还尚未有针对黄酒中5-HMF含量的相关标准,但相较于我国GH/T 18796—2012《蜂蜜》中所规定蜂蜜中5-HMF含量不得高于40 mg/kg的标准,本研究所有样品中的5-HMF含量均较低,未超标。

表3 2-MEI、4-MEI和5-HMF的加标回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Spiked recoveries and RSDs of 2-MEI, 4-MEI and 5-HMF ($n=6$)

样品	本底值/ $(\mu\text{g/mL})$	分析物	加标量/ $(\mu\text{g/mL})$	回收率/%	RSDs/%
客家娘酒	N.D.	2-MEI	0.010	88.7	10.50
			0.100	92.8	4.16
			0.200	108.0	7.56
	N.D.	4-MEI	0.010	77.5	2.04
			0.100	90.8	5.49
			0.200	102.0	2.68
	30	5-HMF	50.0	95.7	4.25
			100	98.4	6.62
			200	97.7	3.10

注: N.D.表示无。

3 结论与讨论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定客家娘酒中2-甲基咪唑、4-甲基咪唑和5-羟甲基糠醛的分析方法。采用BEH HILIC色谱柱,甲醇-5 mmol/L氨水作为流动相,能够完全分离目标物,峰型良好且对极性大的分子有较好的保留。相较于UPLC-MS/MS常用的QuEChERS、离子对萃取、超临界流体萃取等预处理方法,选择直接稀释法和标准加入法进行前处理,减少了试剂的使用种类和使用量,简化了前处理操作。该方法经验证,线性关系良好、回收率高、精密度好,适用于客家娘酒中3种加工副产物(2-甲基咪唑、4-甲基咪唑和5-羟甲基糠醛)的定性定量检测。

本研究向有关监督部门提供检测数据和技术支持的同时,建议生产厂家可以从选择酿酒原料、酿酒技术、温度等源头方面进行控制,改进酿造技术,尽可能减少危害化合物的产生。

参考文献

- [1] 高云超, 宫晓波, 杨春英, 等. 广东河源客家黄酒氨基酸分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9503-9515.
GAO YC, GONG XB, YANG CY, *et al.* Analysis of amino acids for Hakka rice wine from Guangdong Heyuan [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(24): 9503-9515.
- [2] 谢广发, 戴军, 赵光鳌, 等. 黄酒中的 γ -氨基丁酸及其功能[J]. 中国酿

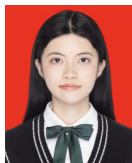
- 造, 2005, (3): 49-50.
XIE GF, DAI J, ZHAO GAO, *et al.* γ -aminobutyric acid in the rice wine and its healthy function [J]. China Brew, 2005, (3): 49-50.
- [3] 谢广发. 黄酒的功能性成分与保健功能[J]. 酿酒, 2008, 35(5): 14-16.
XIE GF. Functional constituents and health function of Chinese rice wine [J]. Liquor Mak, 2008, 35(5): 14-16.
- [4] 阙斐. 黄酒的抗氧化活性及其中的酚类物质[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
QUE F. Antioxidant activities of yellow wine and the involvement of phenolic compounds [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.
- [5] 方晓弟. 广东客家娘酒中低聚糖的研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2013.
FANG XD. Research of oligosaccharides in Hakka rice wine [D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2013.
- [6] 陈文锋. 传统客家娘酒的酿造工艺[J]. 客家文博, 2017, (4): 12-15.
CHEN WF. The brewing process of traditional Hakka rice wine [J]. Hakka Cult Herit Vis, 2017, (4): 12-15.
- [7] 蔡玮红, 洗燕萍, 罗海英, 等. UPLC-MS/MS法同时测定焙烤食品中的丙烯酰胺、4-甲基咪唑与5-羟甲基糠醛[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 249-254.
CAI WH, XIAN YP, LUO HY, *et al.* Determination of acrylamide, 4-methylimidazole and 5-hydroxymethylfurfural in baked food using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(2): 249-254.
- [8] FERNANDES JO, FERREIRA MA. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 4-(5) methylimidazole in ammonia caramel colour using ion-pair extraction and derivatization with isobutyl chloroformate [J]. J Chromatogr A, 1997, 786(2): 299-308.

- [9] International Agency for Research on Cancer (IARC). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–129 [EB/OL]. [2021-06-29]. <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc> [2021-07-15].
- [10] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of caramel colours (E 150 a, b, c, d) as food additives [EB/OL]. [2011-03-08]. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2004> [2021-07-15].
- [11] European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to Flavouring Group Evaluation 13 (FGE.13): Furfuryl and furan derivatives with and without additional side-chain substituents and heteroatoms from chemical group 14 (Commission Regulation (EC) No 1565/2000 of 18 [EB/OL]. [2005-07-06]. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/215> [2021-07-15].
- [12] 裴珂晗, 欧仕益. 食品中 5-羟甲基糠醛的形成与控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(1): 251–256.
PEI KH, OU SY. Formation and mitigation of 5-hydroxymethylfurfural in foods [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(1): 251–256.
- [13] 王冰玉, 赵文英, 曹晓荣, 等. 高效液相色谱法测定咪唑生产工艺中反应液中咪唑及 2 种杂质 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(6): 692–695.
WANG BY, ZHAO WY, CAO XR, *et al.* HPLC determination of the imidazole and 2 impurities of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in reaction solutions in production process [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2020, 56(6): 692–695.
- [14] 李玲, 吴琦, 王婷婷. 高效液相色谱法测定脑心舒口服液液中杂质 5-羟甲基糠醛含量[J]. 中国药业, 2021, 30(8): 46–48.
LI L, WU Q, WANG TT. Content determination of 5-hydroxymethylfurfural in Naoxinshu oral liquid by HPLC [J]. China Pharm, 2021, 30(8): 46–48.
- [15] 彭向前, 冯玮, 石海英, 等. 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.
PENG XQ, FENG W, SHI HY, *et al.* Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in caramel pigment by capillary gas chromatography [J]. China Cond, 2012, 37(8): 83–85.
- [16] GASPAREM SM, LOPES JF. Simple gas chromatographic method for furfural analysis [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(14): 2762–2767.
- [17] WIECZOREK MN, PRZYGOŃSKI K, JELEŃ HH. Determination of 4-methylimidazole in ammonia caramel using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) [J]. J Food Qual, 2018, 2018: 1–5.
- [18] 庞扬海, 甄振鹏, 高裕锋, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定食糖中 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑[J]. 甘蔗糖业, 2021, 50(3): 74–79.
PANG YH, ZHEN ZP, GAO YF, *et al.* Determination of 4-methylimidazole and 2-methylimidazole in sugar by HPLC-MS/MS [J]. Sugar Can, 2021, 50(3): 74–79.
- [19] 闵宇航, 黄璐瑶, 余晓琴, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定酱卤肉制品中 1-甲基咪唑、2-甲基咪唑及 4-甲基咪唑[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 261–266.
MIN YH, HUANG LY, YU XQ, *et al.* Determination of 1-methylimidazole, 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in sauced meat produces by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(10): 261–266.
- [20] 庞扬海, 高裕锋, 甄振鹏, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定红糖中 5-羟甲基糠醛[J]. 甘蔗糖业, 2021, 50(2): 97–101.
PANG YH, GAO YF, ZHEN ZP, *et al.* Determination of 5-hydroxymethylfurfural in brown sugar by HPLC-MS/MS [J]. Sugar Can, 2021, 50(2): 97–101.
- [21] WU XL, YU SJ, KANG KR. Development of a monoclonal antibody-based indirect competitive immunosorbent assay for 4-(5)-methylimidazole detection in caramels [J]. Food Chem, 2015, 170: 354–359.
- [22] 吕燕彦. 食品中 5-羟甲基糠醛酶联免疫检测方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2012.
LV YY. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural in food [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2012.
- [23] GOU L, ZENG X, DU H, *et al.* Sensitive detection of trace 4-methylimidazole utilizing a derivatization reaction-based ratiometric surface-enhanced Raman scattering platform [J]. Talanta, 2021, 237: 122925.
- [24] SHIH YH, LIRIO S, LI CK, *et al.* Determination of imidazole derivatives by micellar electrokinetic chromatography combined with solid-phase microextraction using activated carbon-polymer monolith as adsorbent [J]. J Chromatogr A, 2016, 1428: 336–345.
- [25] GÜRAY T, TUNCEL NY, TUNÇEL M, *et al.* Validated micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC) method for determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and comparison with HPLC [J]. Chem Pap, 2019, 73(9): 2209–2220.
- [26] PETRUCI JFS, PEREIRA EA, CARDOSO AA. Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in caramel colors by capillary electrophoresis [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(9): 2263–2267.
- [27] WU JH, FENG TT, LIANG X, *et al.* Determination of HMF in vinegar and soy sauce using two-step ultrasonic assisted liquid-liquid micro-extraction coupled with capillary electrophoresis-ultraviolet detection [J]. Food Anal Methods, 2018, 11(2): 479–485.
- [28] MARCONDES MM, DELLA BF, SERAGLIO SKT, *et al.* Determination of 5-hydroxymethylfurfural in tomato-based products by MEKC method [J]. J Food Compos Anal, 2021, 100: 103927.
- [29] 伊魁宇, 曹焱鑫, 李继民, 等. 分光光度法测定酱油中 5-羟甲基糠醛的研究[J]. 化学通报, 2014, 77(3): 282–284.
YI KY, CAO YX, LI JM, *et al.* Determination of 5-hydroxymethylfurfural in soy by the method of derivative spectrophotometry [J]. Chemistry, 2014, 77(3): 282–284.
- [30] GÜRKAN R, ALTUNAY N. Quantification of 5-hydroxy methylfurfural in honey samples and acidic beverages using spectrophotometry coupled with ultrasonic-assisted cloud point extraction [J]. J Food Compos Anal, 2015, 42: 141–151.
- [31] 公丕学, 廉贞霞, 薛霞, 等. 固相萃取 UPLC-MS/MS 测定黄酒中 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(14): 136–142.
GONG PX, LIAN ZX, XUE X, *et al.* Determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in yellow wine by solid phase extraction ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2019, 40(14): 136–142.
- [32] 王德利, 冷佳蔚, 姜俊, 等. 液相色谱串联质谱法测定保健食品中 3 种甲基咪唑类物质[J]. 化工设计通讯, 2021, 47(6): 91–93.

- WANG DL, LENG JW, JIANG J, *et al.* Determination of three methylimidazoles in health food by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chem Eng Des Commun*, 2021, 47(6): 91–93.
- [33] WU C, WANG L, LI H, *et al.* Combination of solid-phase extraction with microextraction techniques followed by HPLC for simultaneous determination of 2-methylimidazole and 4-methylimidazole in beverages [J]. *Food Chem*, 2020, 305: 125389.
- [34] 吴翠华, 郑学股, 李巧琪, 等. QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱法测定酱油中的 4-甲基咪唑[J]. *当代化工*, 2018, 47(3): 653–656.
- WU CH, ZHENG XY, LI QQ, *et al.* Determination of 4-methylimidazole in soysauce by QuEChERS coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Contemp Chem Ind*, 2018, 47(3): 653–656.
- [35] ZHANG L, LI C. Simultaneous analysis of 2-methylimidazole, 4-methylimidazole, and 5-hydroxymethylfurfural potentially formed in fermented soy sauce by “quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe” purification and UHPLC with tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(2): 501–508.
- [36] 王高敏, 吴越, 王霞, 等. 超临界流体-高效液相色谱法萃取芹菜中芹菜素[J]. *青岛科技大学学报(自然科学版)*, 2021, 42(5): 24–29.
- WANG GM, WU Y, WANG X, *et al.* Supercritical fluid-high performance liquid chromatography extraction of apigenin from celery [J]. *J Qingdao Univ Sci Technol*, 2021, 42(5): 24–29.
- [37] YAMAGUCHI H, MASUDA T. Determination of 4(5)-methylimidazole in soy sauce and other foods by LC-MS/MS after solid-phase extraction [J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(18): 9770–9775.
- [38] GOSCINNY 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 Addit Contam A*, 2014, 31(10): 1652–1660.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



王彬濛, 主要研究方向为食品科学与营养。

E-mail: 591134531@qq.com



刘 垚, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品加工工艺和食品安全检测技术。

E-mail: 87536189@qq.com