

气相色谱-质谱法检测食品中的丙烯酰胺

沈伟健, 沈崇钰, 赵增运, 陈惠兰, 徐锦忠

(江苏出入境检验检疫局食品实验室, 江苏 南京 210001)

摘要: 建立了一种用于食品中丙烯酰胺含量的气相色谱-质谱联用检测方法。通过水和甲醇提取食品中的丙烯酰胺, 经蛋白变性净化后用溴水对其进行加成衍生化, 再采用有机溶剂进行液液萃取, 之后同三乙胺发生定量反应转化为性质更稳定的产物后由气相色谱-质谱联用仪检测, 同位素内标法定量。该方法在 0.02、0.05 和 0.2 mg/kg 等 3 个添加水平下面粉和面包中丙烯酰胺的回收率处于 80% 和 110% 之间, 相对标准偏差(RSD)不大于 12.7%; 在 0.04 ~ 4.00 mg/L 内呈现良好的线性关系; 灵敏度高, 最低检测限达到 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 选择性好, 能有效消除复杂基质带来的干扰。可作为常见样品中丙烯酰胺含量检测的确证方法。

关键词: 气相色谱-质谱联用; 丙烯酰胺; 炸薯条; 面包

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2006)06-0625-04 栏目类别: 研究论文

Determination of Acrylamide in Foods by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

SHEN Weijian, SHEN Chongyu, ZHAO Zengyun, CHEN Huilan, XU Jinzhong

(Laboratory of food, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: A confirmatory method is presented for the determination of acrylamide in different food products by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The method is based on the extraction of acrylamide with water and methanol, and purification with Carrez I (zinc sulfate) and Carrez II (potassium hexacyanoferrate) solution, followed by bromination onto the acrylamide double bond. The derivative was extracted with ethyl acetate/hexane (4:1, v/v), and converted to the stable 2-bromopropenamide by dehydrobromination using 10% triethylamine, then analyzed by GC-MS, employing $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide as internal standard. In-house validation data for flour and bread showed good accuracy and precision of the method. The recoveries of acrylamide in the French fries and bread were all in the range from 80% to 110% after correction of analyte loss by the internal standard at three spike levels of 0.02, 0.05 and 0.2 mg/kg, and relative standard deviations (RSDs) no more than 12.7%. The limits of detection for flour and bread were estimated at 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); acrylamide; French fries; bread

丙烯酰胺的 CAS 号为 79-06-01, 相对分子质量 71.09, 分子式为 $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ 。丙烯酰胺作为已知的神经毒素, 可通过未破损的皮肤、黏膜、肺和消化道吸收入人体, 分布于体液中。它具有致畸、致癌作用。2002 年 4 月, 瑞典国家食品管理局(SNFA)和斯德哥尔摩大学共同公布了某些油炸类食品的检验结果, 宣布在人类高温加工的食品中发现含量高达 2.3 mg/kg 的丙烯酰胺, 引起了全球强烈关注。

丙烯酰胺主要产生于高温加工的食品中, 食品在 120 $^\circ\text{C}$ 下加工即会产生丙烯酰胺。对 300 种食品的检测结果表明, 炸薯条和炸薯片、面包、可可粉、杏仁、咖啡、饼干等食品中普遍含有相当高浓度的丙烯

酰胺。

在 2002 年 6 月世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)联合召开的有关丙烯酰胺的专家会议中对食品中丙烯酰胺分析方法的可靠性评价是会议的议题之一。用于各类食品中丙烯酰胺残留量检测的方法主要有气相色谱法、液相色谱法、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[1-3]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[4-6], 其中, 前两种方法只属于初筛方法; GC-MS 需要衍生化处理, 但是灵敏度高, 方法稳定; LC-MS 不用衍生化, 但是通常要求建立一整套严格而又繁琐的固相萃取净化步骤。

本文方法用水和甲醇提取食品中的丙烯酰胺,

经蛋白变性净化后用溴水进行衍生化,再与三乙胺定量反应生成稳定产物后由 GC-MS 联用仪检测,最后用同位素标记的内标法校正定量。方法只需一步蛋白变性净化步骤就能有效地消除干扰,避免了文献中常用的固相萃取净化步骤,不仅提高了效率,而且降低了分析成本;通过加入三乙胺定量地把 2,3-二溴丙酰胺转化为性质稳定的 2-溴丙烯酰胺,提高了文献[2]中所介绍方法的定量稳定性。

1 实验部分

1.1 试剂与材料

正己烷、丙酮、无水硫酸钠、三乙胺、溴水(溴的质量分数 $\geq 3\%$)和氢溴酸(HBr 的质量分数 $\geq 40.0\%$)均为分析纯;乙酸乙酯为色谱纯;硫代硫酸钠水溶液(1 mol/L),溴化钾,Carrez I 溶液(57.6%(质量分数)硫酸锌水溶液),Carrez II 溶液(28.8%(质量分数)亚铁氰化钾水溶液)。

丙烯酰胺:纯度 $\geq 98\%$ (CIL 公司), $^{13}\text{C}_3$ 标记的丙烯酰胺标准溶液:1 000 mg/L(CIL 公司)

1.2 标准储备液和工作液的配制

1.2.1 丙烯酰胺储备液

准确称取 25 mg 丙烯酰胺标准品(精确到 0.01 mg),用乙酸乙酯溶解并定容到 25 mL 棕色容量瓶中(约 1 000 mg/L),于 4 °C 冰箱中冷藏保存。

1.2.2 丙烯酰胺和 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准工作液

分别准确移取 1 mL $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准溶液和 1 mL 丙烯酰胺标准储备液,用乙酸乙酯分别溶解并定容到两个 25 mL 棕色容量瓶中(均为 40 mg/L),于 4 °C 冰箱中冷藏保存。

1.3 仪器与设备

Agilent 6890N GC-5973 Inert MS 气质联用仪(配备电子轰击离子源(EI)),旋转蒸发器 R-200

(瑞士 Büchi 公司)。

1.4 实验步骤

准确称取粉碎后的样品 2.00(±0.05) g 于 50 mL 离心瓶中,加入 0.1 mL 8 mg/L 的 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺(内标),涡旋混匀后加入 30 mL 水和 5 mL 甲醇,再加入 Carrez I 和 Carrez II 溶液各 2 mL。涡旋 1 min 后超声 10 min,以 2 500 r/min 离心 15 min。过滤于另一个离心管中,准备衍生化。

在样品溶液中加入 7.5 g KBr(已烘烤过)并溶解,用适量氢溴酸调节 pH 值在 1~3 之间,然后加入 10 mL 溴水,涡旋混匀后放入冰箱(4 °C)中 1 h 以上,取出离心管,用 1 mol/L 硫代硫酸钠去除多余的溴,直到黄色完全消失为止。转移到分液漏斗中,用 50 mL,10 mL 乙酸乙酯-正己烷(体积比为 4:1)混合溶剂分两次进行液液萃取,合并有机相,旋转蒸发(40 °C)至约 2 mL,再用氮吹仪吹干,最后用 1 mL 正己烷定容,并过 0.45 μm 有机相滤膜,加入 0.1 mL 三乙胺,然后进行 GC-MS 测定。

1.5 GC-MS 仪器参数与测定条件

1.5.1 气相色谱部分

HP-17ms 弹性石英毛细管柱,30 m \times 0.25 mm i. d.,0.25 μm ;柱温:程序升温,初始温度 50 °C,以 10 °C/min 升至 140 °C,再以 30 °C/min 升至 260 °C,保持 3 min;进样器温度:250 °C;接口温度:280 °C;进样模式:不分流进样;进样量:1 μL ;载气流速:1 mL/min。

1.5.2 质谱部分

四极杆温度:150 °C;离子源温度:230 °C;电子能量:70 eV。数据采集方式:选择离子监测方式(SIM),其中选择离子为 m/z 106,108,133,136,151,152,154,具体情况参见表 1。

表 1 选择离子表

Table 1 The list of selected ions

Test item	Retention time/min	Selected ions (m/z)	Quantitative ion (m/z) and its ion formula	Identification ion (m/z) and its ion formula
Acrylamide	7.47	106, 133, 151	151($[\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}]^+$)	106($[\text{C}_2\text{H}_3\text{Br}]^+$) 133($[\text{C}_3\text{H}_2\text{BrO}]^+$)
$^{13}\text{C}_3$ -Acrylamide	7.47	108, 136, 152, 154	154($[\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}]^+$)	108($[\text{C}_3\text{H}_3\text{Br}]^+$) 136($[\text{C}_3\text{H}_2\text{BrO}]^+$) 152($[\text{C}_3\text{H}_4\text{BrNO}]^+$)

2 结果与讨论

2.1 蛋白变性净化

炸薯条和面包中含有较高浓度的蛋白质,运用 Carrez I 和 Carrez II 对含蛋白质的基质进行蛋白沉

淀。同一个阳性面包样品,没有加入蛋白变性剂所得到的萃取离子流色谱图中待测组分峰附近出现了干扰现象,而经过蛋白变性净化后所得到的谱图(如图 1)中待测组分峰旁边没有任何干扰现象,因此蛋白变性净化能有效地消除干扰。

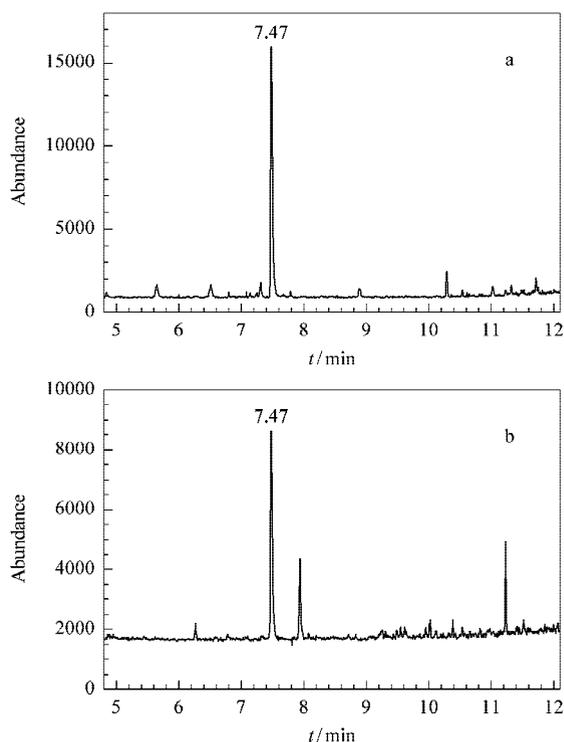


图 1 阳性面包样品经蛋白变性后得到的萃取离子流色谱图

Fig. 1 Extract ion chromatograms of a positive bread sample after protein denaturalization

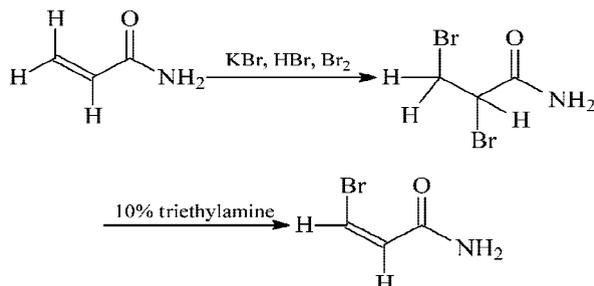
a. extract ion (m/z 151) chromatogram of acrylamide (7.47 min); b. extract ion (m/z 154) chromatogram of $^{13}\text{C}_3$ -acrylamide (7.47 min).

2.2 衍生与稳定化处理

样品中的丙烯酰胺经水提取后,在较强的酸性条件下同溴水发生加成反应,生成 2,3-二溴丙酰胺。之所以进行溴水衍生化主要有两方面的考虑,其一,衍生化产物 2,3-二溴丙酰胺的极性要比丙烯酰胺的极性弱得多,更适合 GC 分析;其二,2,3-二溴丙酰胺的相对分子质量比丙烯酰胺大得多,能改善质谱性能。因为丙烯酰胺的相对分子质量仅为 71,在该质量数附近常用的毛细管气相色谱柱流失产物的碎片离子很多,因此存在着严重的干扰现象,而通过衍生化反应使丙烯酰胺加成了溴元素后,增加了相对分子质量,增强了检测的特异性,较好地避免了柱流失物带来的干扰。

但是由于 2,3-二溴丙酰胺在高温进样口内会分解为 2-溴丙烯酰胺[据文献[7]报道,其中的分解过程与进样口的活性和温度可能存在着一定的相关性],且分解效率至今还没有见到有关报道,因此势必给分析结果带来很大的不确定性,导致分析结果的精密度(或稳定性)不够好。而当在进样前向衍生化后的样品溶液中加入 10%三乙胺时,2,3-二溴丙酰胺会定量地同三乙胺发生反应得到 2-溴丙烯酰胺。因为 2-溴丙烯酰胺性质很稳定,不受进样口

高温的影响,且该反应可在常温下定量进行,消除了分解效率不稳定等因素的不利影响,所以得到的平行试验结果的精密度很好。全部化学反应如下:



2,3-二溴丙酰胺和 2-溴丙烯酰胺的 EI 质谱图很相似。在 EI 离子源的电子轰击下,2,3-二溴丙酰胺($\text{C}_3\text{H}_5\text{Br}_2\text{NO}$)丢失一个溴后形成了 $\text{C}_3\text{H}_5\text{BrNO}$ 离子(m/z 150 及其溴的同位素离子 m/z 152)。而 2-溴丙烯酰胺($\text{C}_3\text{H}_4\text{BrNO}$)相对于 2,3-二溴丙酰胺衍生化产物少了一个 HBr,在 EI 中以分子离子(m/z 149 及其溴的同位素离子 m/z 151)形式出现。同理, $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺($^{13}\text{C}_3\text{H}_4\text{BrNO}$)在 EI 中以分子离子 m/z 152 及其溴的同位素离子 m/z 154 的形式出现。

2.3 质谱条件的建立

图 2 为 2-溴丙烯酰胺的 EI 质谱图。2-溴丙烯酰胺(m/z 149,151)在 EI 中以分子离子峰形式出现。但在进行 SIM 监测时,不适合选择 m/z 149 这个碎片,因为它易受溶剂和食品包装中广泛存在的增塑剂邻苯二甲酸酯(基峰为 m/z 149)的干扰;也不宜选用低于 m/z 100 的易受柱流失影响的离子碎片。在此原则下得到的监测离子及其对应的离子式见表 1。

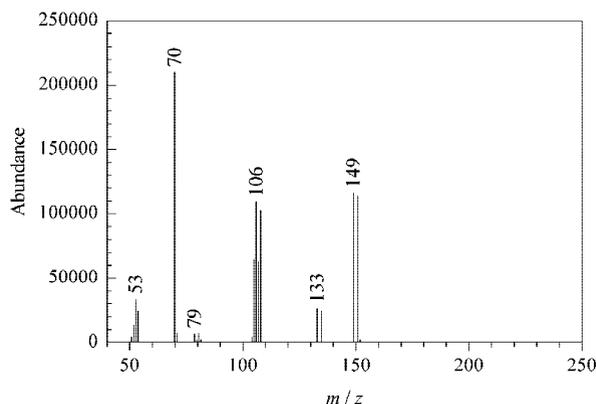


图 2 丙烯酰胺标准溶液(4.00 mg/L)衍生化后的质谱图

Fig. 2 Mass spectrum of the standard solution of acrylamide (4.00 mg/L) after bromination

2.4 方法评价

2.4.1 线性范围与检测限

吸取适量丙烯酰胺标准工作液于离心管中,逐

级稀释,得到其质量浓度分别为 4.00, 0.80, 0.40, 0.08 和 0.04 mg/L 系列标准工作液,依“1.4”节方法加入内标,然后按照衍生化步骤直接衍生化。按照前面的仪器条件进样分析后,以质量浓度 (mg/L) 为横坐标 (x), 丙烯酰胺定量离子的峰面积与内标定量离子的峰面积的比值为纵坐标 (y) 作标准曲线,得到的线性方程为 $y = 0.787x + 0.173$, 相关系数为 0.9945, 这说明在 0.04 ~ 4.00 mg/L 范围内呈现出良好的线性关系。结合质量浓度为 0.04 mg/L 的混合标准溶液谱图,根据检出限浓度处的信噪比 $S/N = 3$ 这一原则可以大致推断出方法的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4.2 方法的准确度和精密度

在炸薯条和面包样品中分别添加 0.02 mg/kg, 0.05 mg/kg 和 0.2 mg/kg 等 3 个水平的标准溶液进行实验,每个添加水平作 7 个平行实验,按照前面的提取净化和检测步骤,再重复做两次,计算平均回收率和相对标准偏差 (RSD),以考察方法的准确度和精密度,具体数据见表 2。

表 2 炸薯条和面包中不同添加水平下丙烯酰胺的回收率和相对标准偏差 ($n = 7 \times 3$)

Table 2 Average recoveries and RSDs of acrylamide at three spike levels in French fries and bread samples ($n = 7 \times 3$)

Sample	Added/ (mg/kg)	Found/ (mg/kg)	Recovery/ %	RSD/ %
French fries	0.02	0.0192	96.0	10.8
	0.05	0.0466	93.2	9.3
	0.2	0.1795	89.8	12.7
Bread	0.02	0.0166	83.0	9.9
	0.05	0.0530	106.0	6.1
	0.2	0.1949	97.5	9.3

由表 2 中数据我们发现,在 3 个添加水平下的回收率都处在 83.0% ~ 106.0% 之间,且相对标准偏差不大于 12.7%,这说明运用本方法得到的数据是准确可靠的。

3 结论

本方法在溴水衍生化之前使用 Carrez 试剂对一些含蛋白质的样品进行净化,有效地去除了基质所带来的干扰。方法在 0.04 ~ 4.00 mg/L 范围内呈现良好的线性关系,而且灵敏度高,最低检测限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在前处理开始时通过加入同位素内标显著地提高了方法的准确度,3 个添加水平下面包和面粉中丙烯酰胺的回收率都处在 83.0% ~ 106.0%。通过三乙胺定量地把 2,3-二溴丙酰胺转化为稳定的 2-溴丙烯酰胺,提高了方法的稳定性,RSD 不大于 12.7%。因此,本方法适用于食品中丙烯酰胺含量的常规检测。

参考文献:

- [1] Pittet A, Périsset A, Oberson J M. J Chromatogr A, 2004, 1035:123
- [2] Zhong Weike, Chen Dongdong, Yong Wei, Liu Zhiming, Qiu Yueming, Tang Yingzhang. Chinese Journal of Chromatography (仲维科,陈冬东,雍炜,刘志明,邱月明,唐英章. 色谱), 2005, 23(3):312
- [3] Rothweiler B, Kuhn E, Prest H. Environmental Monitoring in China (中国环境监测), 2004, 20(5):71
- [4] Riediker S, Stadler R H. J Chromatogr A, 2003, 1020:121
- [5] Fan Xiang, Fang Xiaoming, Chen Jiahua, Lü Jingci, Zhang Xingyi. Chinese Journal of Instrument Analysis (樊祥,方晓明,陈家华,吕敬慈,张星漪. 分析测试学报), 2005, 24(3):82
- [6] Granby K, Fagt S. Anal Chim Acta, 2004, 520:177
- [7] Zhang Y, Zhang G Y, Zhang Y. J Chromatogr A, 2005, 1075:1