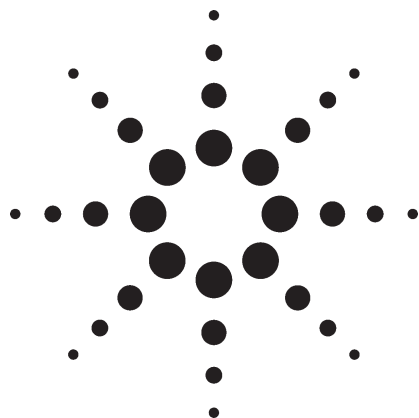


气相色谱 / 质谱法分析食品中的丙烯酰胺

应用



食品安全

作者

Bernhard Rothweiler
Agilent Technologies
Deutschland GmbH
Hewlett-Packard Strasse 8
76337 Waldbronn
Germany

Eberhardt Kuhn
Agilent Technologies, Inc.
91 Blue Ravine Road
Folsom, CA
USA

Harry Prest
Agilent Technologies, Inc.
5301 Stevens Creek Blvd.
Santa Clara, CA
USA

摘要

要揭示烹调食物中是否有丙烯酰胺，需对可疑食品进行检测。经典的方法是用水从食品中提取出丙烯酰胺，再将其转化成溴化衍生物。本文描述了这些衍生物的电子轰击和正离子化学电离响应和谱图。另外，还介绍了一种更直接、更简便的方法，包括丙烯酰胺提取和直接进样，并用正离子化学电离进行分析。这种监测方法快速、可靠、检测限低。

引言

2002年4月瑞典国家食品管理部的科学家们宣布，油炸和烤制食品中丙烯酰胺 (2-propenamide) 的量超过水中许可量的许多倍，说明对人体暴露量比过去预计的要大得多[1-3]。丙烯酰胺 (图1)，一种已知的神经毒素，对人类很可能是一种致癌物质。世界卫生组织认为水中丙烯酰胺的量最多不能超过0.5 µg/L。但是，食品如炸薯条、烤薯片、烤面包片以及其它常见烹制食品中丙烯酰胺含量却在100到1000 µg/kg。生的食品中没有发现丙烯酰胺，煮制食物中的量也没有达到检测限。最近的研究表明，丙烯酰胺是通过 Maillard 反应形成的，当氨基酸和糖 (例如，天门冬酰胺和蔗糖) 一起加热时就会发生这种反应。如此高浓度丙烯酰胺的发现，引发了对各种食品中丙烯酰胺的研究。

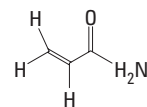


图1. 丙烯酰胺 (2-丙烯酰胺), $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$,
71.08 g/mole, CAS号 79-06-1

丙烯酰胺分析方法

已经有许多种仪器分析方法用于测定丙烯酰胺。最近



的方法是用液相色谱接串联质谱 (MS-MS) 检测, 大约能测定 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) 或更低, 用 72 到 55 m/z 转换 (例如, [5])。这个方法由于样品制备简便, 很有吸引力。用电子轰击 (EI) 电离 MS 检测的气相色谱法, 通常因分子较小而需要衍生化。本文介绍的是另一种气相色谱 / 质谱 (GC/MS) 方法, 能够更快地进行筛查, 象常规方法一样, 最后定量也要通过衍生化。这是丙烯酰胺快速、相对简便的分析方法。

用 GC/MS-SIM 正离子化学电离进行快速筛查

丙烯酰胺 EI 电离质谱 (图 2) 得到的都是很低质量数的离子: 71、55、44 m/z 。虽然在低于 ng 水平有较高的强度, 但这些离子容易受食品样品的干扰。正离子化学电离 (PCI) 质谱图是用氨气得到的, 离子化选择性更高, 比 EI 更适合于食品基质的分析, 图 3。氨 PCI 产生两个离子: 72 m/z , 质子化分子, $[\text{M}+\text{H}]^+$, 和加合离子 89 m/z , $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 。PCI 对丙烯酰胺的分析具有良好的选择性和灵敏度 - 能检测到 pg 水平。

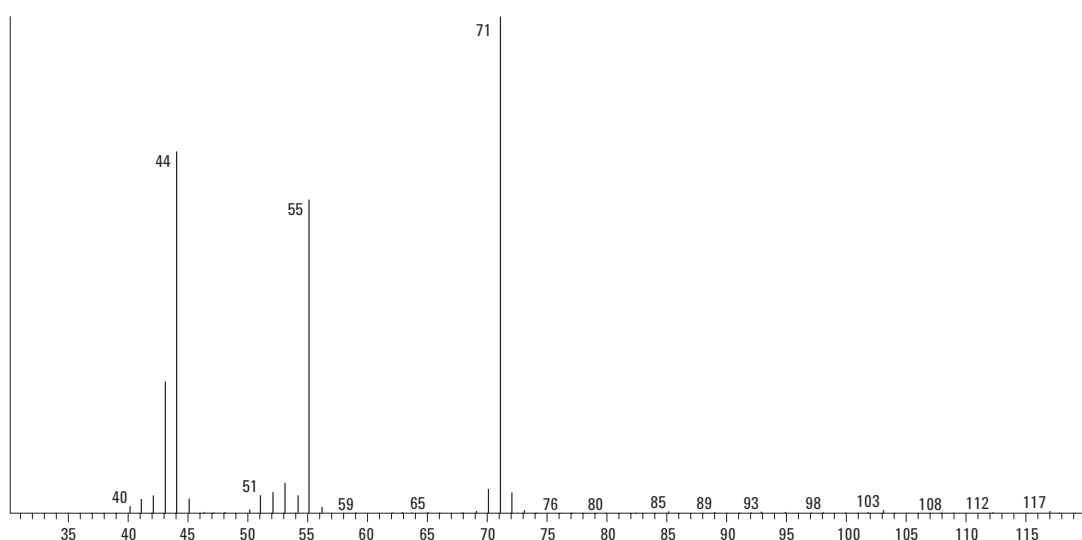


图 2. 丙烯酰胺的 EI 电离质谱图 (40-120 amu)

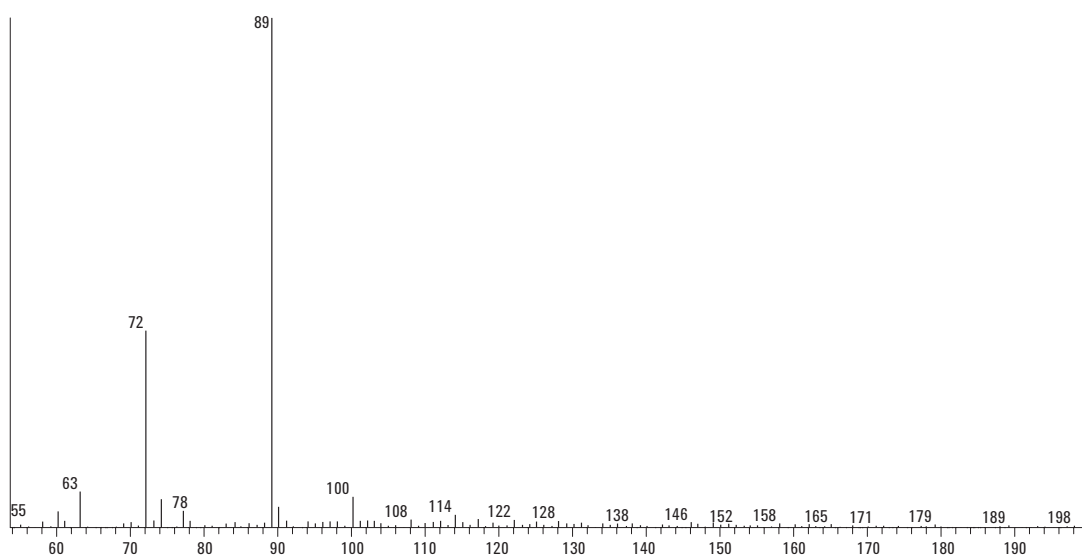


图 3. 丙烯酰胺与氨反应气 (简称氨气) 的 PCI 质谱图 (60-200 amu)

图4显示了仪器参数一节中提到的方法所得 100 pg - 10 ng 的校正曲线

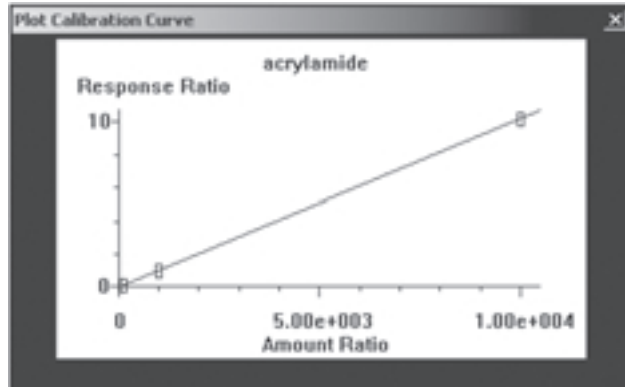


图 4. 100 pg 到 10 ng PCI- 氨 SIM 校正曲线($R^2=1.00$)

筛查样品的制备

PCI提高了特异性,用这种方法可以进行快速筛查,只需要对样品进行非常简单而快速的净化。食品样品均质、磨碎后,取0.4 g样品转入离心管中。样品用1 mL 甲醇:水(9:1 v/v)溶液在超声清洗器中提取10分钟。超声前,先将1 μg 标记的 $^{13}\text{C}_3$ - 丙烯酰胺加到1 mL 溶液里。超声后,样品在8000 rpm下离心5分钟。取出上清,液转移到样品瓶中,进样,用GC/MS-PCI选择离子检测(SIM)分析。丙烯酰胺PCI监测方法的参数见表1。

表 1. PCI 监测丙烯酰胺的 GC/MS 仪器方法参数

进样口参数		
衬管:	安捷伦部件号 5062-3587, 单锥形, 带玻璃毛	
温度:	220°C	
模式:	脉冲不分流	
脉冲压力:	30.0 psi	
脉冲时间:	1.20 分钟	
吹扫流量:	50.0 mL/min	
吹扫时间:	1.20 分钟	
总流量:	54.7 mL/min	
省气模式:	关闭	
柱箱参数		
柱箱最高温度:	260°C	
柱箱平衡时间:	0.20 分钟	
初始温度:	60°C	
初始时间:	1.00 分钟	
升温速率	温度	时间
12°C/min	230°C	10.00 分钟
运行时间	25.17 分钟	
柱参数		
毛细管柱	安捷伦 19091X-136 HP-INNOWax	
最高温度:	260°C	
长度:	60.0 m	
直径:	250.00 μm	
膜厚:	0.25 μm	
载气:	氮气	
模式:	恒流	
出口和压力:	2.0 mL/min MSD 真空	
MSD 参数		
溶剂延迟	7.00 分钟	
调谐:	PCI 氮气 (1.2 mL/min)	
EM 设置:	PCI 自动调谐 + 400 V	
离子源温度:	250°C	
四极杆温度:	150°C	
SIM 参数		
分辨率:	高	
组离子	驻留时间(ms)	
72.0	60	
75.0	60	
89.1	60	
92.1	60	

筛查方法结果与讨论

图5显示了一种白面包样品的萃取离子流图。由于PCI的选择性,在丙烯酰胺附近的基线几乎没有波动。提取浓度大约为34 ng/mL或每克白面包85 ng。当氨基酸和糖在一起加热时会生成丙烯酰胺,因而有理由怀疑进样过程中在进样口内也可能生成丙烯酰胺。为了试验这种可能性,在白面包提取物中添加100 ng 丙烯酰胺,再进行分析。测定结果是135 ng/mL,表明,由于进样口温度相对较低或者脉冲压力进样方式使样品在内衬管中滞留时间较短,减缓了样品中丙烯酰胺的形成,或衬管中生成的丙烯酰胺重复性。这可能不代表所有提取物或所有相似条件下的情况。

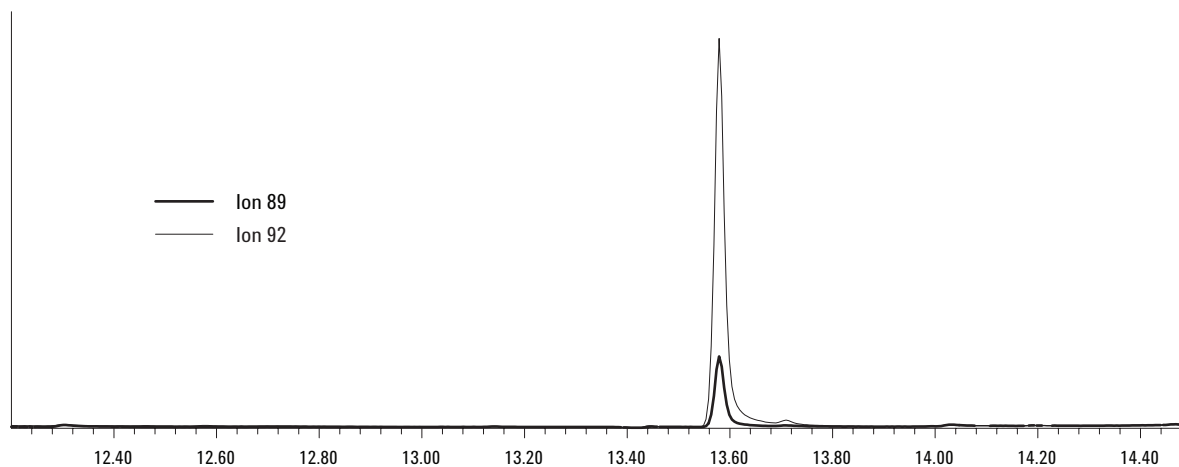
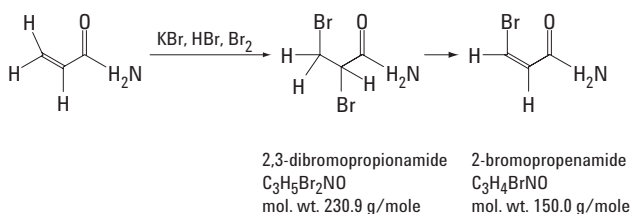


图5. 白面包样品中丙烯酰胺 (84 ng/g) 的萃取离子流图

丙烯酰胺及其衍生物的 GC/MS 方法

另一种方法是用水从食品中提取，原位衍生，液液萃取 [6,7]。在这一方法中，用（热）水按 1 g : 10 mL 的比例从均质化样品中提取丙烯酰胺。随后加入一种强溴化试剂，使其发生反应。反应将丙烯酰胺转变成 2,3-二溴丙酰胺。加入硫代硫酸钠去除剩余的溴化试剂，并将溶液离心和/或过滤。2,3-二溴丙酰胺经提取进入乙酸乙酯层。一种选择是进一步处理这种衍生物，使其形成更稳定的分析物 2-溴丙酰胺。全部化学反应见方程式 1。甲基丙烯酰胺， $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$ 常被用作回收替代物，所以这里对其行为有所报导。



方程式 1

实验

丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺纯品 (Sigma-Aldrich 公司) 溶于 HPLC 级甲醇。1 mg/mL 标记的丙烯酰胺，1,2,3- $^{13}\text{C}_3$ 丙烯酰胺，甲醇溶液 (剑桥同位素实验室, Andover, MA)。溴化剂溶液按文献 [6]，用试剂级 KBr、HBr 和溴水 (VWR 旧金山, CA) 制备。1N 硫代硫酸钠 (VWR, 旧金山, CA)。衍生化反应也按文献 [6] 进行，将 1 mL 溴化剂加至含丙烯酰胺的溶液中；衍生化过夜，用 1 滴 1N 硫代硫酸钠中和，再用 1 mL 乙酸乙酯 (农药级, VWR) 提取。二溴衍生物直接进样。加三乙胺生成单-溴衍生物。

表 2 和表 3 列出了分析二溴丙烯酰胺和溴化丙烯酰胺的仪器条件。所有数据是以 2 μL 进样量采集的。

表 2. 用 EI 和甲烷与氨 PCI 分析二溴丙烯酰胺 (丙烯酰胺的二溴化衍生物) 的 GC/MS 仪器方法参数

进样口参数		
衬管:	安捷伦部件号 5181-315, 双锥形	
温度:	250 °C	
模式:	脉冲不分流	
脉冲压力:	30 psi	
脉冲时间:	1.20 分钟	
吹扫流量:	50.0 mL/min	
吹扫时间:	1.20 分钟	
总流量:	54.7 mL/min	
省气模式:	打开	
柱箱参数		
柱箱最高温度:	325 °C	
柱箱平衡时间:	0.50 分钟	
初始温度:	50 °C	
初始时间:	1.00 分钟	
升温速率	温度	时间
45 °C /min	300 °C	2.00 分钟
运行时间	8.56 分钟	
柱参数		
毛细管柱	安捷伦 122-3832 DB-35 ms	
最高温度:	340 °C	
长度:	30 m	
直径:	250 μm	
膜厚:	0.25 μm	
载气:	氦气	
模式:	恒流	
出口和压力:	1.2 mL/min MSD 真空	
EI 和 PCI MSD 参数		
溶剂延迟	5.00 分钟	
EI 参数		
EI 调谐	自动调谐	
EM 设置	自动调谐 + 400 V	
离子源温度	230 °C	
四极杆温度	150 °C	
EI SIM 参数		
分辨率	低	

(待续)

**表 2. 用 EI 和甲烷与氨 PCI 分析二溴丙烯酰胺
(丙烯酰胺的二溴化衍生物) 的 GC/MS
仪器方法参数 (续)**

组离子	驻留时间 (ms)
2,3 二溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物
149.9	10 ms
151.9	10 ms
106.0	10 ms
¹³ C ₃ -2,3- 二溴丙烯酰胺	内标
152.9	10 ms
154.9	10 ms
109.9	10 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物
120.0	10 ms
122.0	10 ms
164.0	10 ms
166.0	10 ms
PCI 参数	
PCI 调谐:	PCI 自动调谐
EM 设置:	PCI 自动调谐 + 400 V
离子源温度:	250 °C
四极杆温度:	150 °C
PCI SIM 参数	
甲烷反应气 (简称甲烷气)	MFC 20% (1.0 mL/min)
分辨率:	低
组离子	驻留时间 (ms)
2,3 二溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物
231.9	10 ms
233.9	10 ms
149.9	10 ms
151.9	10 ms
¹³ C ₃ -2,3- 二溴丙烯酰胺	内标
234.9	10 ms
236.9	10 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物
245.9	10 ms
247.9	10 ms
氨气:	MFC 20% (1.0 mL/min)
分辨率:	低
组离子	驻留时间 (ms)
2,3 二溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物
248.9	10 ms
246.9	10 ms
250.9	10 ms
¹³ C ₃ -2,3- 二溴丙烯酰胺	内标
251.9	10 ms
249.9	10 ms
253.9	10 ms
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物
262.9	10 ms
260.9	10 ms
264.9	10 ms

**表 3. 2- 溴丙烯酰胺 (丙烯酰胺的单溴衍生物)
GC/MS EI 仪器方法参数**

进样口参数		
衬管:	安捷伦部件号 5062-3587, 单锥形, 带玻璃毛	
温度:	250 °C	
模式:	脉冲不分流	
脉冲压力:	30.0 psi	
脉冲时间:	1.20 分钟	
吹扫流量:	50.0 mL/min	
吹扫时间:	1.20 分钟	
总流量:	54.7 mL/min	
省气模式:	关	
柱箱参数		
柱箱最高温度:	325 °C	
柱箱平衡时间:	0.5 分钟	
初始温度:	50 °C	
初始时间:	1.00 分钟	
柱参数		
毛细管柱	安捷伦 122-5533 DB3-5MS	
升温速率	温度	时间
25 °C /min	140 °C	0.00 分钟
45 °C /min	300 °C	1.50 分钟
运行时间	9.66 分钟	
最高温度:	350 °C	
长度:	30.0 m	
直径:	250 µm	
膜厚:	1.00 µm	
载气:	氮气	
模式:	恒流	
出口和压力:	1.2 mL/min MSD 真空	
EI 和 PCI 的 MSD 参数		
溶剂延迟	5.00 分钟	
EI 参数		
EI 调谐	自动调谐	
EM 设置	自动调谐 + 400 V	
离子源温度	230 °C	
四极杆温度	150 °C	
EI SIM 参数		
分辨率:	低	
组离子	驻留时间 (ms)	
2- 溴丙烯酰胺	丙烯酰胺分析物	
148.9	20 ms	
150.9	20 ms	
105.9	20 ms	
¹³ C ₃ -2- 溴丙烯酰胺	内标	
151.95	20 ms	
153.95	20 ms	
2,3- 二溴 -2- 甲基丙烯酰胺	辅助替代物	
120.0	10 ms	
122.0	10 ms	
164.0	10 ms	
166.0	10 ms	

结果和讨论

EI 离子化

图6和图7分别显示了2,3-二溴丙烯酰胺和2-溴丙烯酰胺的EI质谱图。请注意这两种丙烯酰胺溴化衍生物有相似的质谱图。在EI中,2,3-二溴丙烯酰胺丢失了一个溴产生 C_3H_5ONBr 离子,同位素丰度与其单溴同类化合物相当。在溶液中加入三乙胺(碱),使其失去HBr,产生单溴化物 C_3H_4ONBr ,比二溴衍生物少含一个氢,在EI中以分子离子形式出现。质谱图共有 C_2H_3Br 离子,归属为碎片105.9和107.9 m/z 。请注意,用 $^{13}C_3$ -丙烯酰胺作内标时,由于有这个 C_2H_3Br 碎片,所以不能用107.9离子进行丙烯酰胺定量。二溴衍生物比单溴化物的响应更大,没有149碎片,它来自溶剂和食品包装中普遍存在的邻苯二甲酸酯干扰物。这两

种化合物的EI-SIM在10到500 $pg/\mu L$ 范围内都呈良好的线性,见图8和图9,但较好的EI检测和较高的柱箱温度流出,使二溴衍生物比单溴衍生物更具吸引力。但是,大家早就知道2,3-二溴丙烯酰胺在进样口里会分解,形成2-溴丙烯酰胺。这种成分的转化与进样口活性有关,因此,分析二溴丙烯酰胺要使用双锥形衬管,而分析溴化丙烯酰胺时则使用带玻璃棉的单锥形衬管。有必要用 ^{13}C 标记的替代物校正二溴衍生物的降解,但甲基丙烯酰胺替代物也可以很好的校正单溴代丙烯酰胺的回收率。由于上述原因和文献中提到的用途,图10中显示了溴代甲基丙烯酰胺的EI图谱,离子列于方法表中。按GC程序,2,3-二溴-2-甲基丙烯酰胺,这一替代物正好在2,3-二溴丙烯酰胺之前出峰,并远在2-溴丙烯酰胺之后。

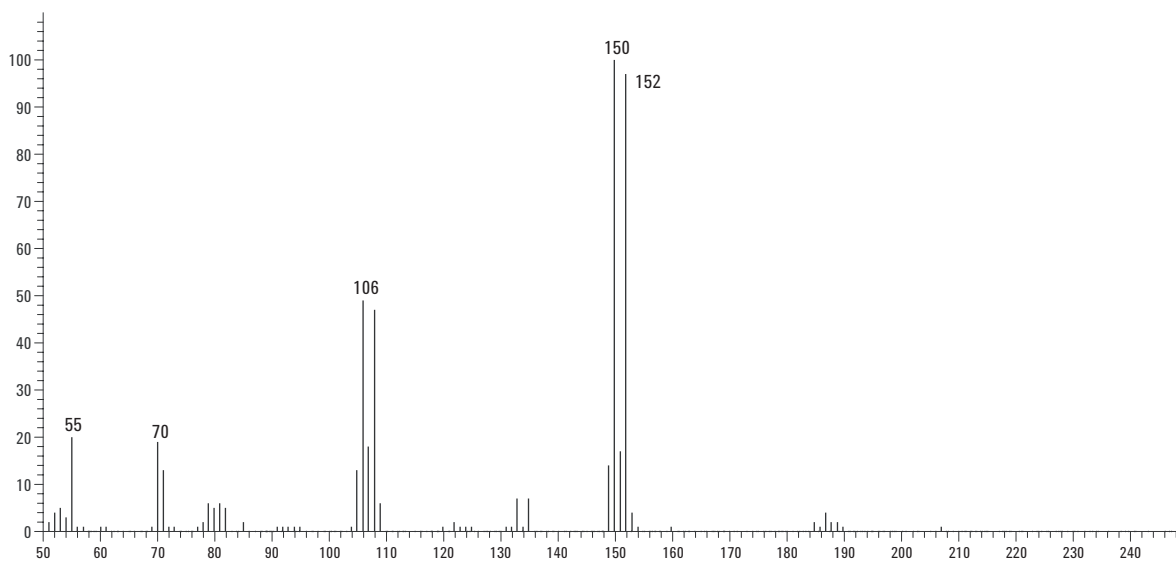


图6. 2,3-二溴丙烯酰胺的EI电离谱图

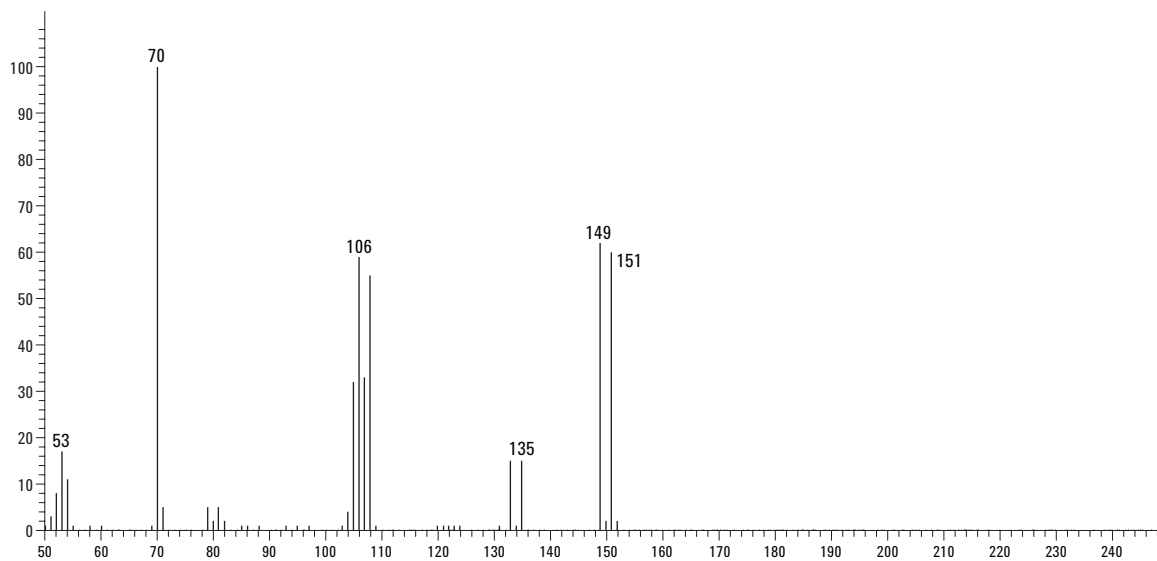


图 7. 2- 溴丙烯酰胺的 EI 电离谱图

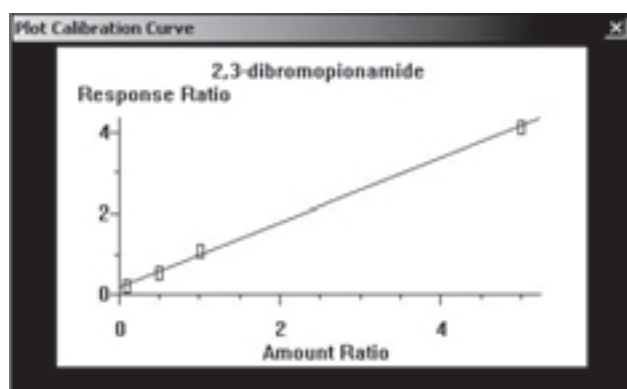


图 8. 2,3- 二溴丙烯酰胺从 10 到 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的校正曲线 ($R^2=0.998$)

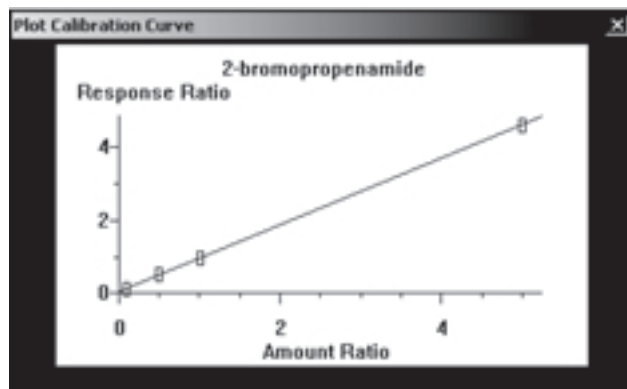


图 9. 2- 溴丙烯酰胺从 10 到 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的校正曲线 ($R^2=0.999$)

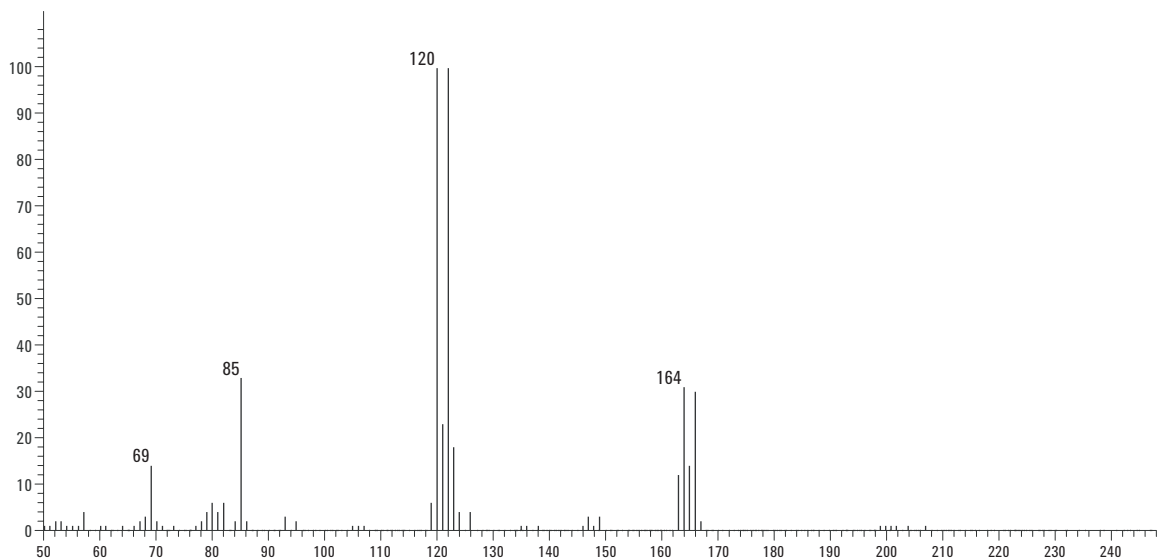


图 10. 甲基丙烯酰胺替代物, 2,3-二溴-2-甲基丙烯酰胺的 EI 电离谱图

PCI

用甲烷和氨气得到的 2,3-二溴丙烯酰胺 PCI 谱图见图 11 和图 12。用甲烷, 最高质量碎片是 $[M+H]^+$; 用氨气, 是 $[M+NH_4]^+$ 。用甲烷的响应比用氨要高, 如果食品样品的背景不成为问题, 丙烯酰胺定量将会有很好的选择性。用甲烷和氨气在 10-500 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 之间的校正与 EI 相似 ($R^2 > 0.998$)。重要的是, 在甲烷和氨 PCI 中, 较低质量碎片 m/z 72 和 89, 不能用于 SIM 定量。这些很强的碎片显然是丢失 Br_2 产生的, 与上面提到的离子不同。

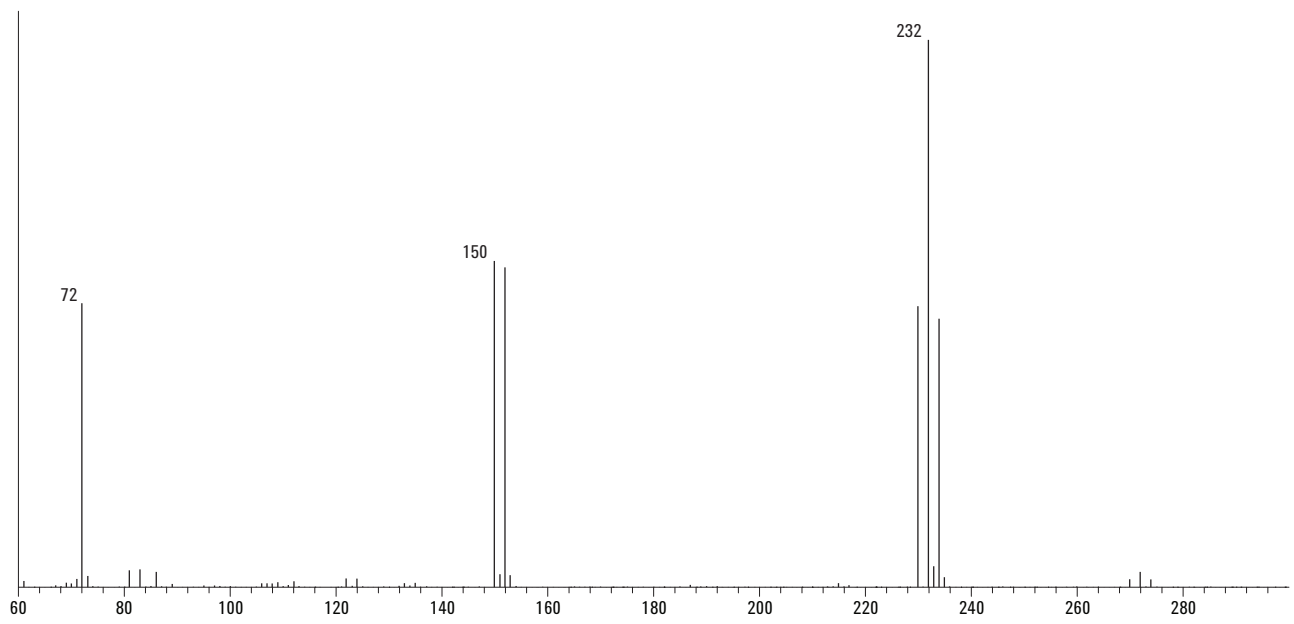


图 11. 用甲烷气体得到的 2,3-二溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (60-300 amu)

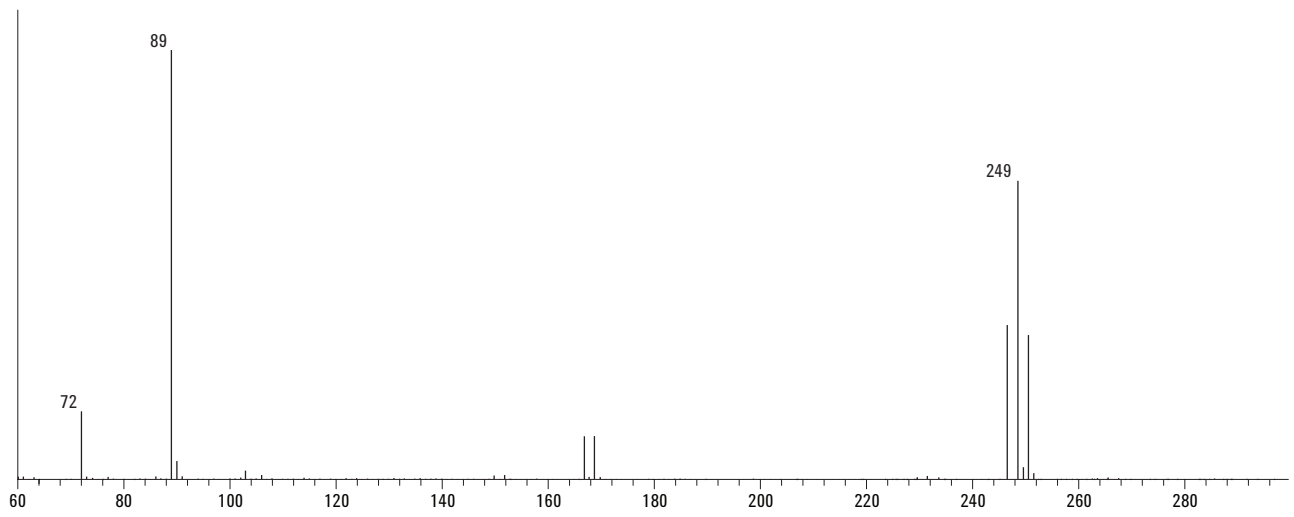


图 12. 用氨气得到的 2,3-二溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (60-300 amu)

与EI的情况相似，用这两种气体 2,3-二溴丙烯酰胺的 PCI 响应都要超过 2-溴丙烯酰胺。用甲烷和氨得到的谱图，见图 13 和图 14。2-溴丙烯酰胺最高质量碎片，用甲烷也是 $[M+H]^+$ ，用氨是 $[M+NH_4]^+$ 。为了更完整，也做了溴代甲基丙烯酰胺替代物的谱图，见图 15 和图 16。

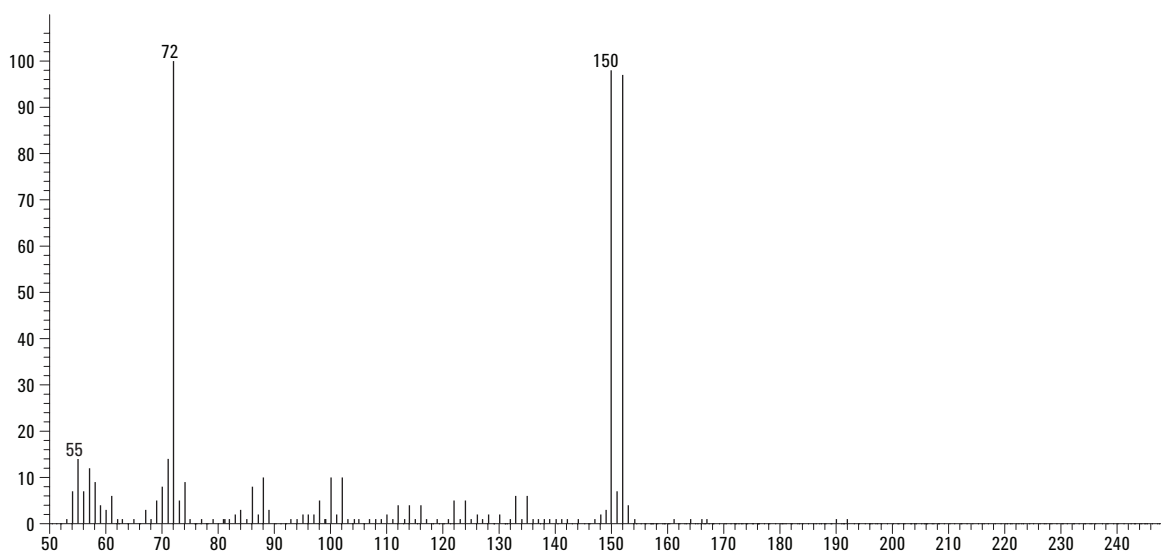


图 13. 用甲烷气体得到的 2-溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (50-250 amu)

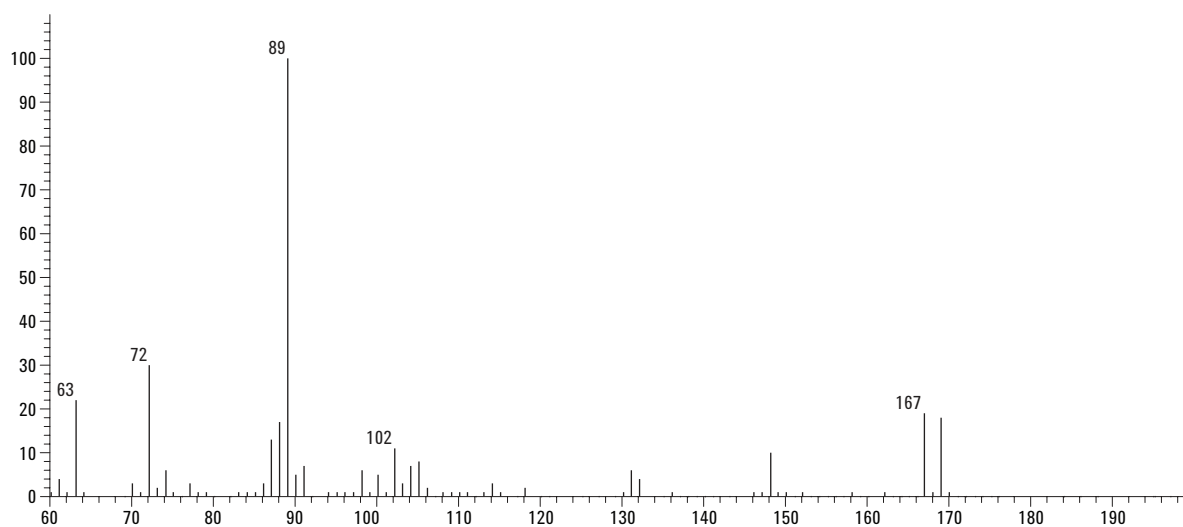


图 14. 用氨气得到的 2-溴丙烯酰胺 PCI 谱图 (60-200 amu)

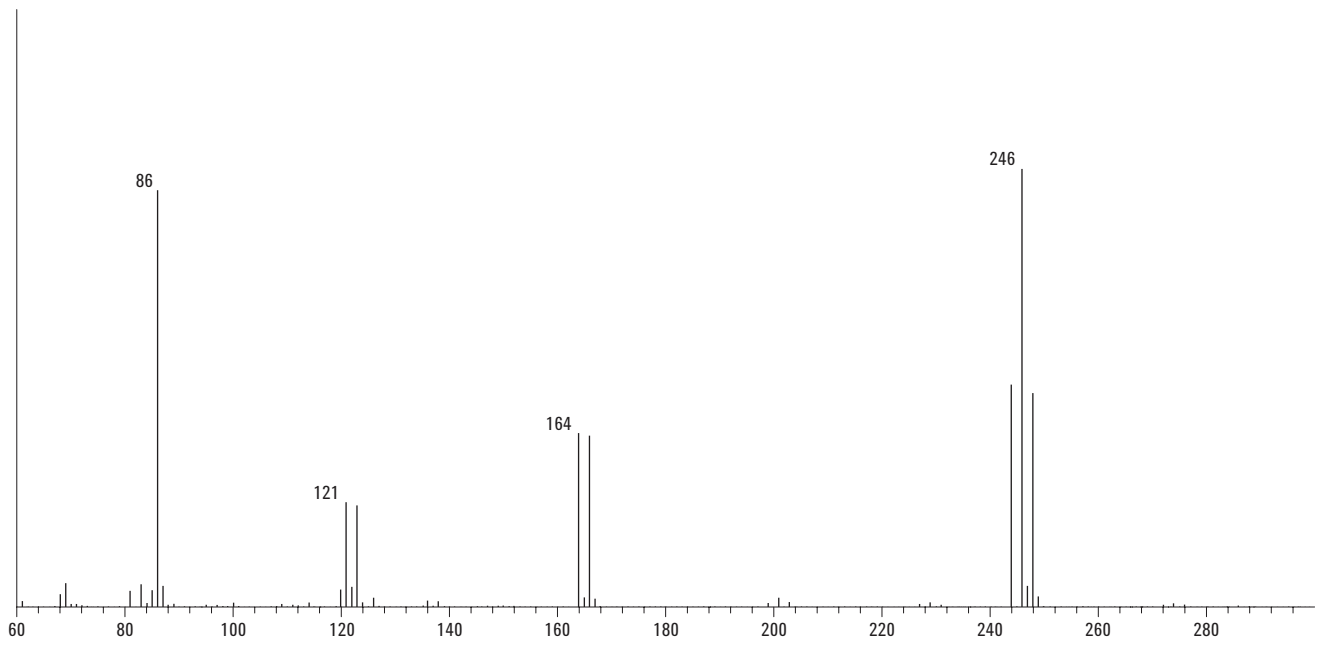


图 15. 用甲烷气体得到的 2,3-二溴-2-甲基丙烯酰胺 (甲基丙烯酰胺衍生物) PCI 谱图(60-300 amu)

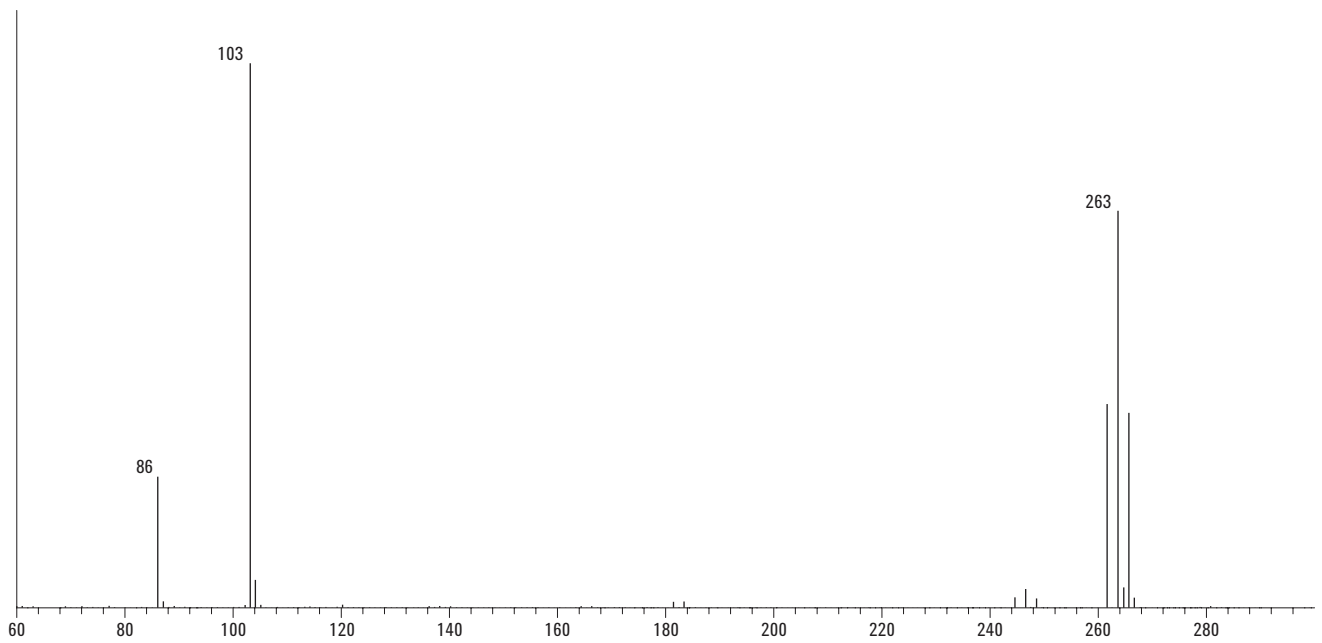


图 16. 用氨气得到的 2,3-二溴-2-甲基丙烯酰胺 PCI 谱图

结论

由于丙烯酰胺在食品中广为发现，这里介绍了多种方法。用PCI快速扫描丙烯酰胺是一种直接而简便的方法，检测灵敏，而且能够定量。在使用溴代衍生物的方法中，研究表明二溴代丙烯酰胺比2-溴丙烯酰胺检测和定量效果更好。如果对某些食品使用EI测定出现问题，PCI是一种值得探索的方法。甲烷气比氨气响应要高约2倍。二溴丙烯酰胺可能降解，必须用相应的标记内标化合物进行定量计算。甲基丙烯酰胺替代物也可用于回收率计算。用薯片做实验得到的数据，尽管没有列在这里，证实上述结论是正确的。

参考文献

1. “Swedish researchers report acrylamide found in starchy foods,” (2002) *Chemical & Engineering News*. p. 38.
2. Hileman, B., “Acrylamide worries experts,” (2002) *Chemical & Engineering News*, **80**(27): p. 9.
3. Hileman, B., “Acrylamide found in cooked foods.” (2002) *Chemical & Engineering News*, **80**(19): p. 33.
4. Yarnell, A., “Acrylamide mystery solved.” (2002) *Chemical & Engineering News*, **80**(40): p. 7.
5. Rosen, J. and K. E. Hellenas, “Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry.” (200) *Analyst* (Cambridge, UK), **127**(7): p. 880-882.
6. Castle, L., M. J. Campos, and J. Gilbert, “Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography/mass spectrometry.” (1991) *J Sci Food Agric*, **54**(4): p. 549-555.
7. Castle, L., “Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polyacrylamide gel.” (1993) *J Agric Food Chem*, **41**(8): p. 1261-1263.

更多信息

要了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem。

安捷伦公司对本资料中所包含的错误, 及因提供、使用本资料所造成的后果或相关损失概不负责。

本资料的内容、说明及指标如有更改, 恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司版权所有, 2004 年

中国印刷
2004 年 5 月 10 日
5989-0602CHCN