

## 柱前衍生化-气相色谱-质谱法定量测定食品中丙烯酰胺的含量

杨斯超, 张 慧, 汪俊涵, 陈 芳\*

( 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 农业部果蔬加工重点开放实验室,  
果蔬加工教育部工程研究中心, 北京 100083)

**摘要:** 建立了气相色谱-质谱(GC-MS)定量测定食品中丙烯酰胺含量的分析方法。选择<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-丙烯酰胺作为内标物。通过超纯水提取食品中的丙烯酰胺,经正己烷脱脂两次后,在酸性条件下选用溴化钾/溴酸钾为衍生剂进行衍生化反应,再采用乙酸乙酯进行液-液萃取两次,最后用三乙胺将丙烯酰胺转化为更稳定的产物2-溴丙烯酰胺,利用质谱检测器在选择离子扫描模式下测定2-溴丙烯酰胺。该方法在0.05~2.00 mg/kg范围具有良好的线性( $r^2 = 0.9995$ );检出限和定量限分别达到3 μg/kg和7 μg/kg;回收率范围为62.7%~65.5%。通过与前期建立的液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法进行对比,该法在薯片和面包样品中丙烯酰胺的检测结果略偏高,是一种可以用于常见食品中丙烯酰胺含量测定的分析方法。

**关键词:** 柱前衍生化; 气相色谱-质谱; 丙烯酰胺; 食品

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2011)05-0404-05

## Quantification of acrylamide in foods by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pro-column derivatization

YANG Sichao, ZHANG Hui, WANG Junhan, CHEN Fang\*

(College of Food Science & Nutritional Engineering, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Processing of Ministry of Agriculture, Engineering Research Centre for Fruits and Vegetables Processing of Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The quantification of acrylamide in foods was investigated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In this method, <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-acrylamide was used as an internal standard. The samples were homogenized, defatted with hexane and extracted with ethyl acetate for twice. The derivatization of acrylamide into 2-bromopropenamide (2-BPA) was done using potassium bromide/potassium bromate at 4 °C for 90 min. Selective ion monitoring mode was chosen to monitor objective chromatography. This method had a good linearity between 0.05 - 2.00 mg/kg ( $r^2 = 0.9995$ ), and the limits of detection and quantification were 3 μg/kg and 7 μg/kg, respectively. The recoveries of acrylamide were in the range of 62.7% - 65.5%. In order to confirm this GC-MS method, the acrylamide in foods was also determined by high performance liquid chromatography coupled to quadrupole tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), which had been proved in our laboratory. The concentrations of acrylamide in the samples quantified by GC-MS were slightly higher than those detected by HPLC-MS/MS. This method can be used to quantify acrylamide in normal foods.

**Key words:** pro-column derivatization; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); acrylamide; foods

丙烯酰胺(AA)是一种广泛存在于高温热加工食品中的2A类致癌物<sup>[1]</sup>。2002年瑞典国家食品管

理局(SNFA)和斯德哥尔摩大学率先报道在一些油炸和烧烤淀粉类食品中检出丙烯酰胺,且其含量远

\* 通讯联系人: 陈 芳, 博士, 副教授, 研究方向为农产品加工及贮藏。E-mail: chenfang221@gmail.com.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2009BADB9B00)。

收稿日期: 2011-01-09

超过饮用水中的最大允许量  $0.5 \mu\text{g/L}$ <sup>[2]</sup>。自此,世界各国纷纷对丙烯酰胺展开研究。

由于食品的组成成分复杂,而丙烯酰胺的含量又很低,如何快速、准确检测食品中的丙烯酰胺已经成为一个研究热点。目前,食品中丙烯酰胺的检测方法主要有液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)和气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[3-4]</sup>。与HPLC-MS/MS相比较,GC-MS具有较高的灵敏度(一般GC-MS为 $5 \sim 10 \mu\text{g/kg}$ ,HPLC-MS/MS为 $20 \sim 50 \mu\text{g/kg}$ ),而且方法稳定。我国于2008年7月首次发布了检测食品中丙烯酰胺的行业标准(SN/T 2096-2008)<sup>[5]</sup>。该标准采用饱和溴水和氢溴酸作为丙烯酰胺衍生剂,通过添加 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标物,选用GC-MS测定焙烤和油炸类食品中的丙烯酰胺。但该法需要9 h的过夜衍生,所耗时间较长。Nemoto等<sup>[6]</sup>则采用溴化钾和溴酸钾对丙烯酰胺进行衍生,仅需90 min即可将丙烯酰胺完全衍生为2-溴丙烯酰胺(2-BPA),大大缩短了衍生时间。在该GC-MS方法中,采用 $^{13}\text{C}$ -丙烯酰胺作为内标物,由于该内标物纯度较低使得方法的检出限偏高,并且固相萃取(SPE)柱的使用增加了样品前处理步骤。本文在前人研究的基础上,简化了样品的前处理,在未经SPE柱净化的条件下,选用 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺作为内标物,分别选择  $m/z$  149 和 152 作为 2-BPA、 $^{13}\text{C}_3$ -2-BPA的定量离子,快速测定了以薯片、面包为代表的油炸类和焙烤类食品中丙烯酰胺的含量,并与HPLC-MS/MS的检测结果进行了比较。

## 1 材料与试剂

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 7890A 气相色谱仪; Agilent 5975C 质谱仪(电子轰击离子源(EI)); Agilent DB-5 毛细管色谱柱( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ ); R-200 旋转蒸发仪(香港永先公司); CR21G III 离心机(日本 HITACHI 公司); 2000D 超纯水仪(北京长风仪器仪表公司); Vortex-2 涡旋振荡仪(江苏其林贝尔有限公司); DC12H 氮吹仪(上海安普有限公司)。

正己烷、三乙胺、溴化钾、溴酸钾、硫代硫酸钠、浓硫酸、无水硫酸钠(分析纯,北京化工厂),其中无水硫酸钠需在  $650 \text{ }^\circ\text{C}$  下灼烧 5 h 后使用。乙酸乙酯、丙酮(色谱纯,美国 Honeywell 公司)。

丙烯酰胺标准品(纯度  $>99.8\%$ , 美国 Sigma-Aldrich 公司),  $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准溶液(纯度  $>99\%$ , 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司)。

实验样品为一般市售的面包、薯片。

### 1.2 丙烯酰胺储备液、中间液和工作液的制备

准确称取 25 mg 丙烯酰胺标准品(精确到 0.01 mg),用超纯水溶解并定容至 25 mL,于棕色瓶、 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中冷冻保存。

分别准确吸取 0.5 mL 丙烯酰胺储备液和 0.5 mL  $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺标准溶液,均配制成相应的 20 mg/L 中间液,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中冷藏保存。

分别配制 2 mg/L 丙烯酰胺工作液及 120 mg/L  $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺工作液(现用现配)。

### 1.3 实验步骤

准确称取 1.50 g 研磨粉碎后的样品于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 15  $\mu\text{L}$  120 mg/L  $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺工作液及 30 mL 超纯水,旋涡振荡 2 min 充分混匀。以 7 000 r/min 速率冷冻离心 10 min,取 20 mL 上清液。向上清液中加入 10 mL 正己烷进行脱脂,旋涡振荡 2 min,并重复上述脱脂过程 1 次。将弃去正己烷层后的溶液衍生。

用 5 mol/L 浓硫酸调提取液 pH 低于 1。分别加入 10 g 溴化钾及 6 mL 0.1 mol/L 溴酸钾,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下衍生 90 min 后,加入 1 mol/L 硫代硫酸钠终止衍生反应(至黄色褪去)。用 10 mL 乙酸乙酯提取衍生后的丙烯酰胺两次,以使其充分转移至有机相。加入 8 g 无水硫酸钠,旋涡振荡 2 min,离心(9 000 r/min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) 15 min 后取出。将提取液转移至 100 mL 浓缩瓶中,于  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中减压浓缩至约 1 mL,再用氮气吹干上述浓缩液,并用 1 mL 丙酮复溶混匀。于该溶液中加入 20  $\mu\text{L}$  三乙胺,旋涡振荡后过 0.22  $\mu\text{m}$  有机膜,滤液供 GC-MS 测定。

### 1.4 GC-MS 测定条件

#### 1.4.1 GC 条件

Agilent DB-5 毛细管柱;柱温升温程序:初始温度  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ,以  $15 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  的速度升至  $240 \text{ }^\circ\text{C}$  并保持 11.3 min;进样口温度:  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ ;接口温度:  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ ;传输线温度:  $240 \text{ }^\circ\text{C}$ ;进样体积: 2  $\mu\text{L}$ (无分流);载气流速: 1 mL/min。

#### 1.4.2 MS 条件

EI 电离能量: 70 eV;离子源温度:  $230 \text{ }^\circ\text{C}$ ;四极杆温度:  $150 \text{ }^\circ\text{C}$ ;扫描方式:选择离子模式(SIM),所选择的特征离子:2-溴丙烯酰胺为  $m/z$  149、151、108、106、70;  $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺为  $m/z$  152、154、110、108、73。分别选择  $m/z$  149 和 152 作为 2-溴丙烯酰胺和  $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺的定量离子。

### 1.5 标准曲线的绘制

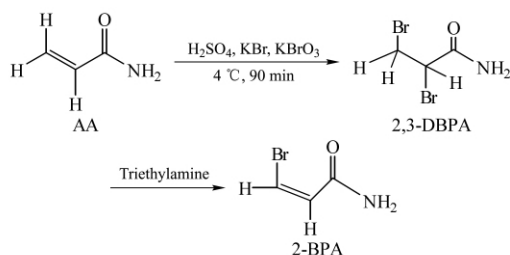
准确吸取 2 mg/L 丙烯酰胺工作液 0.125、0.250、0.500、1.000、1.500、2.000、2.500、3.750、

5.000 mL, 各加入 10  $\mu$ L 120 mg/L 的  $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺工作液, 用超纯水定容至 100 mL。分别吸取 20 mL 上述丙烯酰胺标准溶液, 按 1.3 节方法操作(除了不用正己烷脱脂)。以丙烯酰胺标准工作液的质量浓度为横坐标, 2-溴丙烯酰胺/ $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺的峰面积比为纵坐标, 绘制标准曲线。

## 2 结果与讨论

### 2.1 衍生试剂的选择

GC 和 MS 都要求所研究的化合物易于汽化, 以完整的、没有热降解或分子重排的形式通过 GC 系统并且进入 MS 离子源<sup>[7]</sup>。由于丙烯酰胺分子中含有碳碳不饱和双键, 因此所选用的丙烯酰胺衍生化方式主要通过双键与溴发生加成反应, 通过增加丙烯酰胺的相对分子质量来提高检测的灵敏度, 从而避免小分子的柱流失物对结果的干扰<sup>[8]</sup>。目前, 对丙烯酰胺采用的衍生化试剂主要有两类, 一种采用饱和溴水和溴化氢作为衍生化试剂<sup>[5, 8, 9]</sup>, 此种衍生化方法不仅需要较长时间, 而且饱和溴水较难制备, 操作也相对危险; 相对而言, 另一种衍生方法所采用的溴化钾和溴酸钾<sup>[6, 10, 11]</sup>则在安全性方面提高很多, 所需衍生时间较少。其化学反应为:



丙烯酰胺在酸性条件下, 与溴化钾和溴酸钾生成的溴发生加成反应, 生成 2,3-二溴丙烯酰胺(2,3-DBPA)。由于 2,3-二溴丙烯酰胺在高温进样口不稳定, 会有一部分被分解为 2-溴丙烯酰胺。为提高检测结果的准确度, 首先将三乙胺与 2,3-二溴丙烯酰胺反应, 使其完全转化为 2-溴丙烯酰胺后, 再进入 GC-MS 进行测定。在全扫描模式下, 所得衍生后的丙烯酰胺质谱图见图 1。

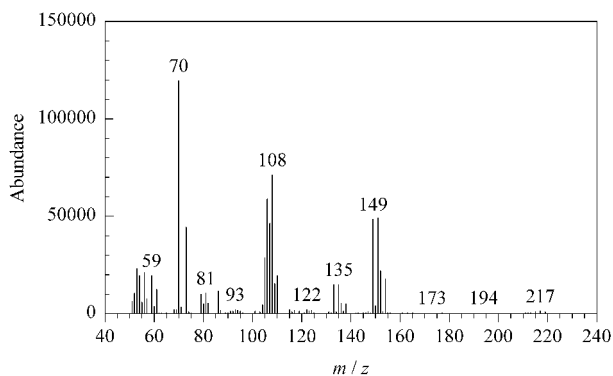


图 1 丙烯酰胺标准溶液衍生后的全扫描质谱图  
Fig. 1 Scan mass spectrum of the standard solution of acrylamide after derivatization

### 2.2 净化

根据常用于净化丙烯酰胺的 SPE 柱填料的不同, 分别选择 Cleanert Florisil、Cleanert PEP、Cleanert Silica 作为吸附型填料 SPE 柱, 高分子聚合物 SPE 柱及键合硅胶 SPE 柱的代表, 对衍生后的丙烯酰胺进行净化处理。与未过 SPE 柱方法的回收率数据结果进行比较, 发现过柱对丙烯酰胺的损失较大(回收率分别为 19.2%、23.5%、18.8%)。在实际样品测定中, 本方法省略了 SPE 柱净化的条件下, 目标物的色谱峰分离效果较好(如图 2 所示)。因此, 本方法在丙烯酰胺前处理步骤中省略掉 SPE 柱的净化, 但为达到保护质谱检测器的目的, 在进 GC-MS 前, 将待测物过 0.22  $\mu$ m 有机膜以滤去杂质。

### 2.3 定性、定量离子的选择

根据丙烯酰胺标准溶液衍生后的全扫描质谱图的结果, 从中选取合适的定性、定量离子。各碎片对应的离子式如表 1 所示。

从图 1 可以看出  $m/z$  70、106、108、149、151 是丰度较高的特征碎片离子, 因此选择这几个离子作为 2-溴丙烯酰胺的定性离子; 参考文献[6, 12]选择  $m/z$  149 作为定量离子。同理, 选择  $m/z$  73、108、110、152 作为  $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺的定性离子,  $m/z$  152 为其定量离子。在此条件下进行选择离子

表 1 GC-MS 测定丙烯酰胺的参数

Table 1 GC-MS parameters for determination of acrylamide

| Compound                 | Retention time/min | Selective ion ( $m/z$ )   | Quantitative ion ( $m/z$ ) and formula                            | Qualitative ion ( $m/z$ ) and formula                            |
|--------------------------|--------------------|---------------------------|---|--|
| 2-BPA                    | 7.47               | 70, 106, 108,             | 149<br>[ $\text{C}_3\text{H}_4^79\text{BrNO}$ ] <sup>+</sup>      | 70 [ $\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}$ ] <sup>+</sup>              |
|                          |                    | 149, 151                  |   | 106 [ $\text{C}_2\text{H}_3^79\text{Br}$ ] <sup>+</sup>          |
| $^{13}\text{C}_3$ -2-BPA | 7.47               | 73, 108, 110,<br>152, 154 | 152<br>[ $^{13}\text{C}_3\text{H}_4^79\text{BrNO}$ ] <sup>+</sup> | 108 [ $\text{C}_2\text{H}_3^{81}\text{Br}$ ] <sup>+</sup>        |
|                          |                    |                           |   | 151 [ $\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}$ ] <sup>+</sup>      |
|                          |                    |                           |   | 73 [ $^{13}\text{C}_3\text{H}_4\text{NO}$ ] <sup>+</sup>         |
|                          |                    |                           |   | 108 [ $^{13}\text{C}_2\text{H}_3^79\text{Br}$ ] <sup>+</sup>     |
|                          |                    |                           |   | 110 [ $^{13}\text{C}_2\text{H}_3^{81}\text{Br}$ ] <sup>+</sup>   |
|                          |                    |                           |   | 154 [ $^{13}\text{C}_3\text{H}_4^{81}\text{BrNO}$ ] <sup>+</sup> |

扫描。薯片样品中的丙烯酰胺经过衍生后,得到的2-溴丙烯酰胺、 $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺的提取离子流色谱图如图2所示。

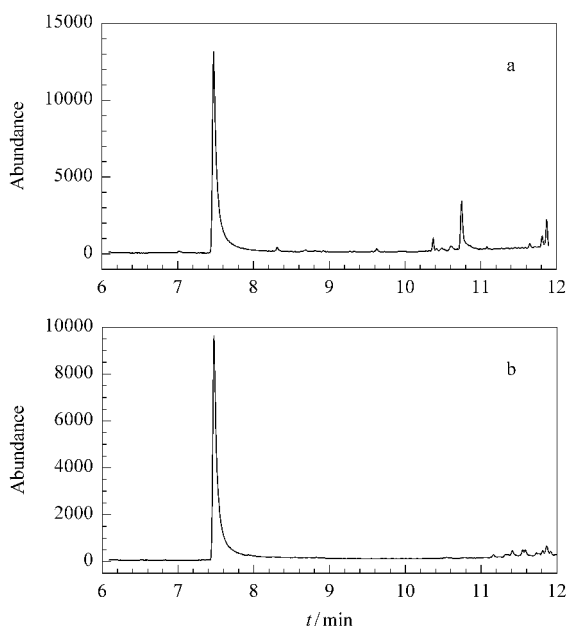


图2 薯片样品经衍生后所得提取离子流色谱图

Fig. 2 Extract ion chromatograms of potato chips after derivatization

a. 2-BPA ( $m/z$  149); b.  $^{13}\text{C}_3$ -2-BPA ( $m/z$  152).

由于2-溴丙烯酰胺和 $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺的化学性质相同,因此其在色谱柱内分配系数一致。从图2可知,二者在7.47 min共同流出。分别提取该时间 $m/z$  149、152的2-溴丙烯酰胺及 $^{13}\text{C}_3$ -2-溴丙烯酰胺的色谱峰进行丙烯酰胺的定量。

## 2.4 方法学评价

### 2.4.1 线性关系、检出限及定量限

按1.5节方法处理样品后,采用内标法绘制标准曲线,所得回归方程为 $y = 0.0007x + 0.0125$ ,线性范围0.05~2.00 mg/kg,相关系数为0.9995,线性关系良好。相对外标法而言,内标法不仅可以避免在前处理过程中由于操作而引起的误差,而且可以有效减少色谱条件(如柱温、载气流速)、进样量等对结果造成的影响。

根据检出限(LOD)和定量限(LOQ)的计算方法,分别以3倍信噪比( $S/N = 3$ )和 $S/N = 10$ 计,得到该方法的LOD、LOQ分别为3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2.4.2 精密度与准确度

采用建立的方法测定同一批薯片和面包中的丙烯酰胺含量,通过计算相对标准偏差(RSD)来考察该方法的精密度。方法的准确度则通过在面包、薯片中添加的丙烯酰胺的回收率来反映(见表2)。

表2 面包、薯片中添加的丙烯酰胺的回收率

Table 2 Recoveries of acrylamide spiked in bread and potato chips

| Matrix       | Background/<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Spiked/<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Found/<br>( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) | Recovery/<br>% |
|--------------|--|--|---------------------------------------|----------------|
| Bread        | 78.4                                       | 40                                     | 103.7                                 | 63.3           |
|              |  | 80                                     | 128.6                                 | 62.7           |
| Potato chips | 834.2                                      | 400                                    | 1087.0                                | 63.2           |
|              |  | 800                                    | 1358.2                                | 65.5           |

实验测定了以面包、薯片为代表的焙烤类和油炸类食品中的丙烯酰胺,其含量分别为78.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和834.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。计算了用该方法测定丙烯酰胺含量的RSD分别为4.4%和5.6%。和其他研究结果<sup>[10-11,13-15]</sup>比较,该方法的回收率偏低,分析原因有两方面:一是有一部分丙烯酰胺在前处理过程中损失,造成结果偏低;二是存在其他杂质的干扰,影响检测的灵敏度。此外,采用本实验室建立的HPLC-MS/MS方法<sup>[16]</sup>检测同一批面包和薯片中的丙烯酰胺,与本方法的结果比对见表3。

表3 GC-MS及HPLC-MS/MS检测面包和薯片中丙烯酰胺的结果对比

Table 3 Comparison of the results of acrylamide in bread and potato chips by GC-MS and HPLC-MS/MS

| Sample       | GC-MS            | HPLC-MS/MS       | Difference<br>$\mu\text{g}/\text{kg}$ |
|--------------|------------------|------------------|---------------------------------------|
| Bread        | 81.6 $\pm$ 3.2   | 73.4 $\pm$ 5.4   | -9.9%                                 |
| Potato chips | 866.1 $\pm$ 47.5 | 715.8 $\pm$ 41.8 | -17.4%                                |

Data are expressed as mean  $\pm$  S. D. ( $n = 3$ ). The differences of the two methods were calculated as  $(a_2 - a_1) / a_1 \times 100\%$ ;  $a_1$ , acrylamide level determined by GC-MS;  $a_2$ , acrylamide level determined by HPLC-MS/MS.

从表3可以看出,对于同一批面包、薯片中丙烯酰胺含量的检测,GC-MS的测定结果略高于HPLC-MS/MS,二者所得数值基本一致。因此,进一步肯定了该方法在定量丙烯酰胺方面的可靠性。

## 3 结语

建立了以溴化钾、溴酸钾作为丙烯酰胺衍生剂,将丙烯酰胺衍生为2-溴丙烯酰胺进行GC-MS测定的方法。通过添加 $^{13}\text{C}_3$ -丙烯酰胺内标物、选择合适的定性及定量离子,在未经SPE柱处理的条件下较好地分离出2-溴丙烯酰胺色谱峰。该方法的定量限达到7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,为食品中痕量丙烯酰胺的测定提供了参考依据。同时,用该法所测的面包、薯片中丙烯酰胺的含量与HPLC-MS/MS结果接近,进一步为该GC-MS方法的应用提供了理论支持。

参考文献:

[1] International Agency for Research on Cancer (IARC): Mon-

- ographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. [1994]. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/mono60-16.pdf>
- [2] Zhang L Y, Liu B, Xu R, et al. Environmental Chemistry (张凌云,刘波,徐荣,等. 环境化学), 2010, 29(1): 152
- [3] Wenzl T, Karasek L, Rosen J, et al. J Chromatogr A, 2006, 1132: 211
- [4] Hoenicke K, Gatermann R, Harder W, et al. Anal Chim Acta, 2004, 520: 207
- [5] SN/T2096
- [6] Nemoto S, Takatsuki S, Sasaki K, et al. J Food Hyg Soc, 2002, 43(6): 371
- [7] Fu D Y. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (傅道韞. 质谱学杂志), 1984, 5(3): 55
- [8] Shen W J, Shen C Y, Zhao Z Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (沈伟健,沈崇钰,赵增运,等. 色谱), 2006, 24(6): 625
- [9] Zhou Y, Zhu S T, Liu R P. Food Science (周宇,朱圣陶,刘仁平. 食品科学), 2006, 27(3): 194
- [10] Zhang H Z, Ma A G, Sun Y Y, et al. Food Science (张辉珍,马爱国,孙永叶,等. 食品科学), 2008, 29(4): 278
- [11] Zhang Y, Ren Y P, Zhao H M, et al. Anal Chim Acta, 2007, 584: 322
- [12] Hou Y, Sun C H, Guan C C, et al. Journal of Hygiene Research (侯咏,孙长颢,关承春,等. 卫生研究), 2007, 36(2): 147
- [13] Jiang J S, Cheng J, Lu Y J, et al. Food Science (蒋俊树,程静,卢业举,等. 食品科学), 2006, 27(11): 430
- [14] Chuang W H, Chiu C P, Chen B H. J Food Biochem, 2006, 30: 497
- [15] Pittet A, Périsset A, Oberson J M. J Chromatogr A, 2004, 1035: 123
- [16] Liu J, ZHAO G H, Yuan Y, et al. Food Chem, 2008, 108: 760