

耐压多样品微量衍生反应装置在气相色谱-质谱联用法 分析极性杂环胺中的应用

王翊如¹, 陈方翔¹, 施雅梅², TAN Connieal¹, 陈曦^{1*}

(1. 厦门大学化学化工学院化学系 分析科学重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 厦门出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 厦门 361012)

摘要: 设计并制作了耐压多样品微量衍生反应装置。在该装置中采用 *N*-(叔丁基二甲基硅烷基)-*N*-甲基三氟乙酰胺 (MTBSTFA, 含 1% 叔丁基二甲基氯硅烷) 硅烷化试剂高温衍生极性杂环胺, 衍生产物可以直接在气相色谱-质谱联用仪上分析。使用该装置, 既可以在比试剂沸点高的温度下实现衍生反应, 也可以实现多个微量样品的同时衍生。着重考察了衍生过程中反应瓶的顶空体积、试剂蒸发面积、温度、时间等实验条件的影响。结果表明, 在 90 °C 衍生时, 与普通衍生装置相比, 使用耐压衍生装置可以有效地减小挥发损失, 显著增大衍生产量; 在 150 °C 衍生时, 由于试剂挥发损失严重导致普通衍生装置无法使用, 而采用耐压衍生装置却可以实现定量衍生, 但通过加温加压方式来加快衍生反应速率的效果并不十分明显。

关键词: 衍生; 耐压装置; 气相色谱-质谱法; 极性杂环胺

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)01-0004-06

Applications of multi-micro-volume pressure-assisted derivatization reaction device for analysis of polar heterocyclic aromatic amines by gas chromatography-mass spectrometry

WANG Yiru¹, CHEN Fangxiang¹, SHI Yamei², TAN Connieal¹, CHEN Xi^{1*}

(1. Department of Chemistry & Key Laboratory of Analytical Science, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Inspection and Quarantine Technology

Center, Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361012, China)

Abstract: A multi-micro-volume pressure-assisted derivatization reaction device has been designed and made for the silylation derivatization of polar heterocyclic aromatic amines by *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamide (MTBSTFA) with 1% catalyst *tert*-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS) at a high temperature. The *tert*-butyldimethylsilyl derivatives then could be automatically analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Using the pressure-assisted device, the silylation reaction may occur at a temperature higher than the boiling points of the reagents, and several micro-volume samples can be simultaneously pretreated in the same device to shorten the sample-preparation time and to improve the repeatability. The derivatization conditions including the headspace volume of the vial, the evaporative surface area of the reagent, derivatization temperature and time have been discussed for the use of the pressure-assisted device. The experimental results proved that the device is an effective way for the simultaneous derivatization of several micro-volume samples at a high temperature. Compared with a common device, the derivative amounts were obviously increased when using the pressure-assisted device at 90 °C. Quantitative derivatization can be achieved even at 150 °C while there was no common device could be applied at such a high temperature due to the heavy losses of reagents by evaporation. However, no

* 通讯联系人. Tel: (0592) 2184530, E-mail: xichen@xmu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21105084); 福建省自然科学基金项目 (2009J01042); 福建省科技重大专项专题项目 (2011YZ0001-1).

收稿日期: 2012-09-07

obviously higher reaction speed has been observed in such a circumstance with a higher temperature and a higher pressure using the pressure-assisted device.

Key words: derivatization; pressure-assisted device; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); polar heterocyclic aromatic amines

杂环胺(heterocyclic aromatic amines)是在食品加工、烹调过程中由于蛋白质、氨基酸热解产生的一类化合物。从化学结构上可以分为氨基咪唑氮杂芳烃和氨基吡啶氮杂芳烃两类,前一类杂环胺可以在普通家庭烹调温度下形成,且具有较强致突变性,因此相比其他杂环胺,它们对于食品的污染以及所造成的健康危害更成为食品安全领域关注的热点^[1-4]。依照其化学特性,亦可以将这一类杂环胺归为极性杂环胺。

杂环胺的分析可以采用高效液相色谱(HPLC)^[5-7]、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)^[8-10]以及气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[11-13]等^[14]方法。由于大多数极性杂环胺并不具有荧光特性,因此采用HPLC分析极性杂环胺,一般只能选择紫外检测器。而受到紫外检测器灵敏度的限制以及食品中杂环胺含量低、背景复杂等不利因素的影响,采用HPLC法往往检测不出食品中的极性杂环胺。HPLC-MS联用法是目前分析极性杂环胺效果最好、成本也最贵的方法。相比HPLC-MS联用法,GC-MS联用法的使用成本则低得多,但由于极性杂环胺挥发性较低,因此采用GC-MS分析极性杂环胺时必须先将样品进行衍生,通过衍生化减小杂环胺的极性,防止其在柱内以及气化室的假吸附,改善流出峰形,同时衍生化基团的特殊性质亦可以提高分析方法的选择性以及灵敏度。

Casal等^[11]在采用*N*-(叔丁基二甲基硅烷基)-*N*-甲基三氟乙酰胺(含1%叔丁基二甲基氯硅烷)作为衍生化试剂衍生极性杂环胺的实验中,发现当温度高于100℃时,由于螺旋盖衬垫损坏产生挥发损失,导致衍生产量下降。同样的实验现象发生在Zhang等报道的文献中^[13],虽然其研究小组采用了不同的衍生化试剂*N,N*-二甲基甲酰胺二叔丁基缩醛来衍生极性杂环胺,但是当衍生化温度超过100℃时,衍生产量亦是呈现明显下降趋势。

在此基础上,本工作设计并研制了耐压多样品微量衍生反应装置,使其能有效保护螺旋盖衬垫从而减小挥发损失,并考察使用该装置在高温高压条件下衍生极性杂环胺的效果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

杂环胺标准品购自百灵威公司,分别为:2-氨基-3-甲基-3*H*-咪唑并[4,5*f*]喹啉(2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5*f*]quinoline, IQ)、2-氨基-3,8-二甲基咪唑并[4,5*f*]喹啉(2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5*f*]quinoxaline, 8-MeIQx)、2-氨基-3,4,8-三甲基-3*H*-咪唑并[4,5*f*]喹啉(2-amino-3,4,8-trimethyl-3*H*-imidazo[4,5*f*]quinoxaline, 4,8-DiMeIQx)、2-氨基-3,7,8-三甲基-3*H*-咪唑并[4,5*f*]喹啉(2-amino-3,7,8-trimethyl-3*H*-imidazo[4,5*f*]quinoxaline, 7,8-DiMeIQx)以及2-氨基-3,4,7,8-四甲基-3*H*-咪唑并[4,5*f*]喹啉(2-amino-3,4,7,8-tetramethyl-3*H*-imidazo[4,5*f*]quinoxaline, 4,7,8-TriMeIQx);各杂环胺标准品的结构式见图1。先将杂环胺标准品分别溶解于色谱纯的甲醇中,配制成质量浓度均为100 mg/L的单一标准溶液,再配制混合标准溶液。

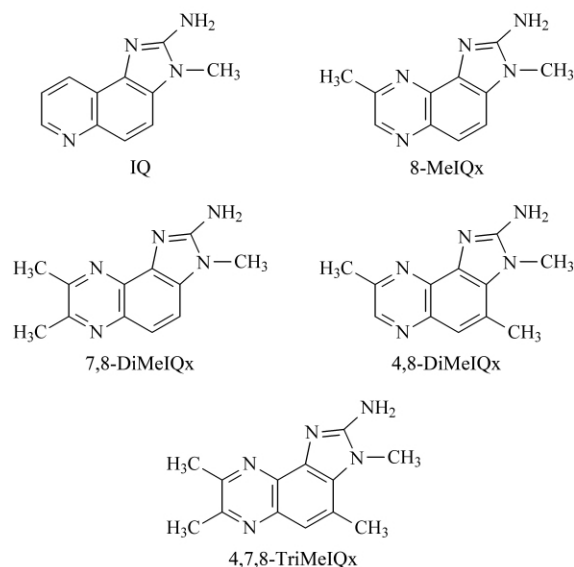


图1 杂环胺标准品的结构式

Fig. 1 Structures of heterocyclic aromatic amines

N-(叔丁基二甲基硅烷基)-*N*-甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA)硅烷化衍生试剂购自美国Regis公司,其中含有1%叔丁基二甲基氯硅烷(TBDMCS)作为

催化剂。

实验采用 Shimadzu GCMS-QP2010 气相色谱-质谱联用仪。毛细管柱为 Rtx-5MS (60 m × 0.32 mm × 0.25 μm)。进样口温度: 290 °C, 不分流进样。升温程序如下: 初始温度 200 °C, 以 20 °C/min 的速度升至 290 °C, 保持 12.5 min。离子源温度: 200 °C。杂环胺衍生物的定性采用全扫描方式, 扫描范围 m/z 35 ~ 400; 杂环胺衍生物的定量采用选择离子检测 (SIM) 方式, 其中 IQ 的 m/z 为 312、255、241, 8-MeIQx 的 m/z 为 327、270、256, 4-β-DiMeIQx 和 7-β-DiMeIQx 的 m/z 为 341、284、270, 4-γ-TriMeIQx 的 m/z 为 298 和 284。

1.2 自制耐压多样品微量衍生反应装置

自制的耐压多样品微量衍生反应装置由图 2 所示的各部件组合而成, 从左往右依次为内插管、玻璃瓶组合件、聚四氟乙烯组合件和不锈钢组合件。250 μL 去活化内插管用于盛放反应液, 内插管的圆锥底部外围附有塑料支脚。内插管可以直接放入 2 mL 玻璃瓶中, 旋紧塑料螺旋盖封口。塑料螺旋盖顶端中央开有圆孔, 一大一小合适的硅橡胶衬垫放置在螺旋盖内底面并封堵圆孔。由于内插管外径与圆孔内径相当, 当玻璃瓶的塑料瓶盖旋紧时, 可以观察到硅橡胶衬垫有内插管口的凸起印痕。再将含有内插管的玻璃瓶放入聚四氟乙烯多孔模块中; 为了避免高压时螺旋盖的硅橡胶衬垫变形, 还需在瓶盖上方加垫厚度、形状、大小合适的弹性硅橡胶垫片后再加封聚四氟乙烯顶盖。最后将放置有玻璃瓶的聚四氟乙烯组合件放入不锈钢套筒中, 加上不锈钢顶板和不锈钢顶盖旋紧密封。旋紧不锈钢顶盖时可以将压力通过不锈钢顶板、聚四氟乙烯顶盖以及加垫的硅橡胶垫片传导给螺旋盖内底面的硅橡胶衬垫, 使之与内插管顶端紧密接触并密闭反应体系。

1.3 实验步骤

取极性杂环胺混合标准溶液 35 μL 于内插管中, 以氮气吹干。加入 35 μL MTBSTFA (含 1% TBDMCS) 衍生化试剂和 35 μL 无水吡啶后加盖密封,



图 2 自制耐压多样品微量衍生反应装置
Fig. 2 Home-made multi-micro-volume pressure-assisted derivatization reaction device

置于 90 °C 烘箱中反应 90 min。冷却后取出玻璃瓶即可直接进样。

2 结果与讨论

2.1 杂环胺衍生

杂环胺的伯胺基团与衍生化试剂 MTBSTFA 的反应原理如图 3 所示, 伯胺上的一个 H 原子被相对分子质量大的特丁基二甲基硅烷基取代, 生成衍生产物单一的特丁基二甲基硅烷基杂环胺, 增加了挥发性, 在气相色谱仪 290 °C 的气化室中可以被气化。经过气相色谱分离和质谱检测, 采用耐压多样品衍生反应装置所获得的杂环胺衍生物的总离子流色谱图如图 4 所示, 色谱峰得到了较好的分离, 同分异构体 4-β-DiMeIQx 和 7-β-DiMeIQx 得到了完全分离。相同质量的 4-β-DiMeIQx 和 7-β-DiMeIQx 在相同条件下进行衍生, 仪器检测 7-β-DiMeIQx 衍生物的灵敏度要比 4-β-DiMeIQx 的高。实验所获得的 5 种杂环胺衍生物的质谱图如图 5 所示。在图 5 中不但可以找到杂环胺衍生物的分子离子峰 $[M]^+$, 也可以找到 $[M - 57]^+$, 说明采用耐压多样品衍生反应装置可以成功地衍生杂环胺。表 1 分别列出 5 种杂环胺衍生物的分子离子及特征碎片离子, 由于杂环胺在衍生化过程中失去伯胺上的 $[H]^+$, 得到质荷比为 115 的 $[(CH_3)_2SiC-$

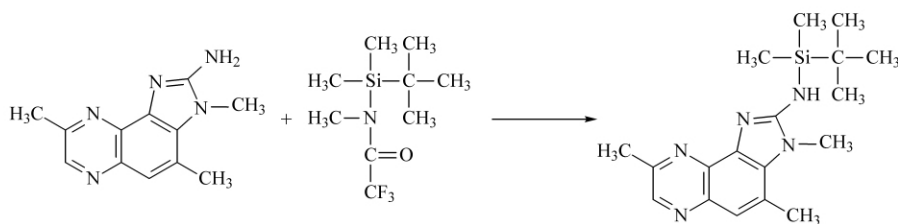


图 3 杂环胺 4-β-DiMeIQx 与 MTBSTFA 的反应原理图

Fig. 3 Reaction between heterocyclic aromatic amine 4-β-DiMeIQx and MTBSTFA

$(\text{CH}_3)_3]^+$ 因此 5 种杂环胺衍生物的分子离子峰 $[\text{M}]^+$ 比相应的杂环胺均大 114。此外, 杂环胺衍生产物亦容易失去 $[\text{C}(\text{CH}_3)_3]^+$, 得到碎片离子峰 $[\text{M} - 57]^+$ 。

表 1 杂环胺衍生物的特征离子
Table 1 Characteristic ions for *tert*-butyldimethylsilyl derivatives of heterocyclic aromatic amines

Compound	M_r	Characteristic ions (m/z)	
		$[\text{M}]^+$	$[\text{M} - 57]^+$
IQ	198	312	255
8-MeIQx	213	327	270
7,8-DiMeIQx	227	341	284
4,8-DiMeIQx	227	341	284
4,7,8-TriMeIQx	241	355	298

2.2 耐压多样品衍生反应装置的使用

由于 $p-\pi$ 共轭效应使得极性杂环胺较难衍生

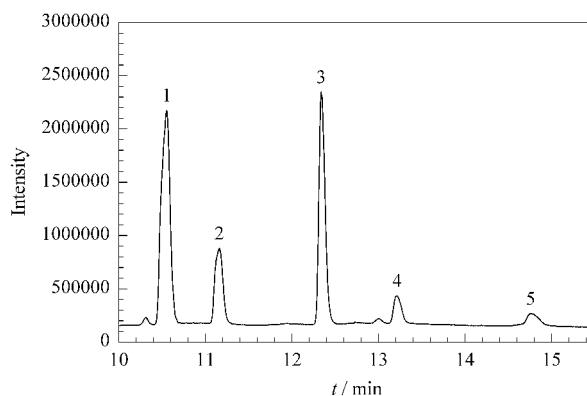


图 4 杂环胺衍生物的总离子流色谱图

Fig. 4 Total ion chromatogram of *tert*-butyldimethylsilyl derivatives of heterocyclic aromatic amines

Sample amounts: 10 mg/L for each heterocyclic aromatic amine.

1. IQ; 2. 8-MeIQx; 3. 7,8-DiMeIQx; 4. 4,8-DiMeIQx; 5. 4,7,8-TriMeIQx.

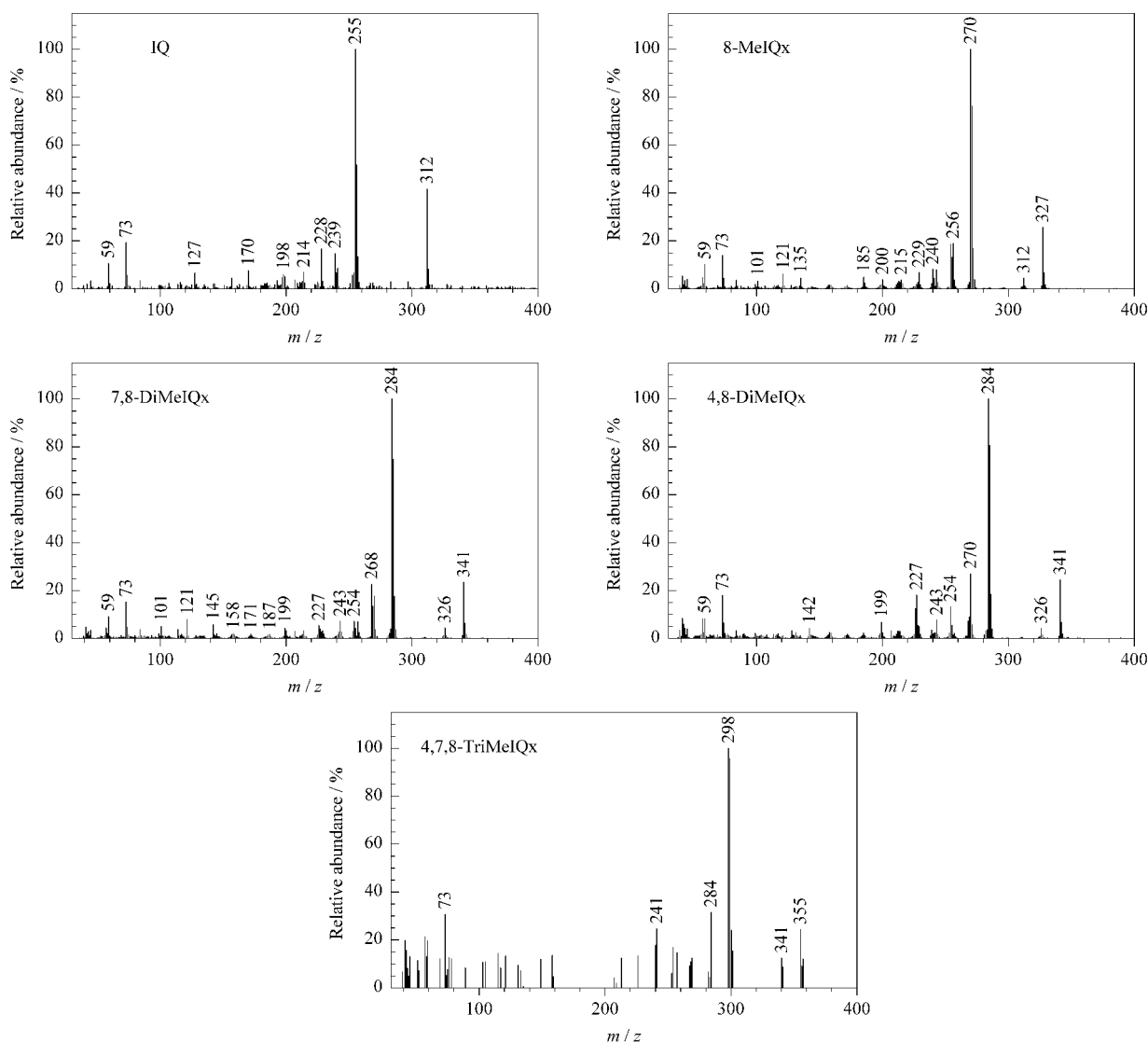


图 5 杂环胺衍生物的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of *tert*-butyldimethylsilyl derivatives of heterocyclic aromatic amines

化,且 MTBSTFA 作为叔丁基二甲基硅烷化(TB-DMS)试剂比三甲基硅烷化(TMS)试剂的空间位阻更大,因此采用 MTBSTFA 衍生极性杂环胺一般需要在高温下才能进行。当衍生化温度高于 100 °C 时,使用普通的衍生反应装置会发生挥发损失,而使用耐压衍生反应装置则可以较好地解决该问题。

实验中亦发现,若直接在 2 mL 气相色谱样品瓶中进行衍生化反应,则由于顶空体积和试液蒸发面积过大,重现性较差。在 2 mL 气相色谱样品瓶中加入 250 μ L 的去活化玻璃内插管,则可以有效地减小顶空体积和试剂蒸发面积。同时,在气相色谱样品瓶盖上方加垫合适厚度、形状、大小的弹性硅橡胶垫片,可以有效地保护瓶盖的硅橡胶衬垫并加强反应装置的气密性,减小反应试剂的挥发。实验数据表明,在同等实验条件下,减小顶空体积和试剂蒸发面积以及加强反应装置的气密性可以显著地提高衍生生产量。

在聚四氟乙烯多孔模块中可以同时放置多个衍生反应玻璃瓶,由于多孔模块呈现圆形且孔均匀分布其中,因此放置在不同孔中的反应瓶受热均匀,可以有效控制由于温度和时间波动带来的随机误差,从而有效地提高实验的重现性。采用两个耐压多样品衍生反应装置同时衍生化 6 个样品,杂环胺 6 次衍生生产量的相对标准偏差(RSD)在 1.1%~5.2%,说明使用该装置可以获得较好的重现性。

2.3 耐压衍生装置与普通衍生装置的衍生效果对比

为了考察自制耐压衍生装置的衍生效果,本实验在普通衍生装置与耐压衍生装置中分别加入等量的极性杂环胺、MTBSTFA(含 1% TBDMCS)衍生化试剂以及吡啶介质,在 90 °C 高温下同时衍生 90 min。其中,普通衍生装置仅包括内插管和玻璃瓶组合件两部分;而耐压衍生装置则包括内插管、玻璃瓶组合件、聚四氟乙烯组合件和不锈钢组合件四部分。

极性杂环胺在普通衍生装置与耐压衍生装置中的衍生效果见图 6。在相同实验条件下,采用耐压衍生装置所产生的极性杂环胺衍生生产物的峰面积,即相当于极性杂环胺的衍生生产量,与采用普通衍生装置所产生的衍生生产量相比有不同程度地增加。其中,对于相对分子质量大的极性杂环胺,衍生生产量的增加更加明显。在 90 °C 衍生化温度下,由于参与衍生反应试剂的蒸汽压增大,而且催化剂 TBDMCS 的沸点(125 °C)以及反应介质吡啶的沸点(115 °C)较低,采用普通衍生装置时,容易导致试剂从瓶盖边沿溢出而产生挥发损失;而采用耐压衍生装置能有效

地避免该现象的发生,因此采用耐压衍生装置后极性杂环胺的衍生生产量明显增加。同时,耐压衍生装置里压力增大也可能减小杂环胺上的氨基与具有空间位阻的衍生化试剂的相互作用的阻力,这亦可能是相对分子质量较大的杂环胺的衍生生产量增加幅度比相对分子质量小的杂环胺 IQ 高的原因。

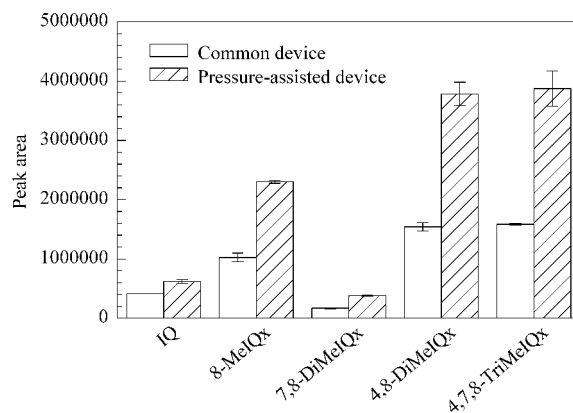


图 6 耐压衍生装置和普通衍生装置中极性杂环胺衍生生产量的比较

Fig. 6 Comparison of derivatization yields of polar heterocyclic aromatic amines using pressure-assisted device and common device

Experimental conditions: derivatization temperature, 90 °C; derivatization time, 90 min; derivatization reagent, 35 μ L MTBSTFA (containing 1% TBDMCS); derivatization medium, 35 μ L anhydrous pyridine. Sample amounts: IQ 5 ng; 8-MeIQx 25 ng; 7,8-DiMeIQx 5 ng; 4,8-DiMeIQx 50 ng; 4,7,8-TriMeIQx 100 ng.

2.4 耐压衍生化温度的影响

比较了采用耐压衍生装置在不同衍生化温度(90 °C与150 °C)条件下分别衍生杂环胺的效果。实验结果表明,在耐压衍生装置中反应 90 min, IQ 在 150 °C 的衍生生产量比 90 °C 时增加了 135%, 8-MeIQx, 7,8-DiMeIQx 和 4,8-DiMeIQx 在 150 °C 的衍生生产量比 90 °C 时增加了 7.2%~11.4%, 而 4,7,8-TriMeIQx 在 150 °C 和 90 °C 所获得的衍生生产量几乎不变。这说明在 90 °C 耐压衍生装置中反应 90 min, IQ 没有反应完全,而 4,7,8-TriMeIQx 则反应完全。采用耐压装置在 150 °C 高温下衍生,可以观察到衍生反应后内插管中的液面高度与衍生反应前一致,说明采用耐压装置进行衍生化反应没有明显的挥发损失。相比较,采用普通衍生装置,温度超过 100 °C 后,可以观察到瓶盖内底面的硅橡胶垫片变形,内插管中的反应液已完全挥发。

2.5 耐压衍生化时间的影响

将杂环胺 IQ 在 150 °C 高温下采用耐压衍生装置分别反应 1、2、3、4 和 5 h。实验结果表明,反应 2 h 后所获得的 IQ 衍生化产物峰面积比反应 1 h 的增

大了66%,而2 h后IQ衍生产量基本恒定。由于在高温高压条件下,相对分子质量小的杂环胺IQ的衍生化仍然需要较长的时间,因此,虽然耐压衍生装置的使用可以较好地提高衍生产量,但是通过加温加压来加快衍生反应速率的效果并不十分明显。

2.6 耐压衍生方法的可行性

衍生方法的定量基础是所测得的杂环胺的衍生化产物的色谱峰面积与杂环胺的量成正比关系。在2.2节考察装置的重现性的基础上,在耐压衍生装置中同时进行一系列不等量杂环胺衍生反应。实验结果表明,该方法的线性范围在15.8~1580 ng,相关系数为0.99,检出限为4.7 ng。因此,采用耐压衍生装置可以对极性杂环胺实现定量分析。

实验过程中亦发现,采用MTBSTFA(含1% TB-DMCS)硅烷化试剂衍生杂环胺后虽然可以直接进样分析,但是硅烷化试剂比较容易污染离子源,因此,在进样前通入其他试剂提前除去过量硅烷化试剂将有利于仪器的维护。

3 结论

本工作通过设计并自制耐压多样品微量衍生反应装置,可以有效地减小试剂的挥发损失,提高衍生产量以及实验的重现性。该装置亦可以推广用于其他气相色谱衍生反应。

参考文献:

[1] Wu Y N. Modern Food Safety Science. Beijing: Chemical Indus-

try Press (吴永宁. 现代食品安全科学. 北京: 化学工业出版社), 2003: 261

- [2] Gibis M, Weiss J. Food Chem, 2012, 134(2): 766
- [3] Viegas O, Amaro L F, Ferreira I M P L V O, et al. J Agric Food Chem, 2012, 60(24): 6235
- [4] Dundar A, Saricoban C, Yilmaz M T. Meat Sci, 2012, 91(3): 325
- [5] Janoszka B, Blaszczyk U, Damasiewicz-Bodzek A, et al. Food Chem, 2009, 113(4): 1188
- [6] Martin-Calero A, Tejral G, Ayala J H, et al. J Sep Sci, 2010, 33(2): 182
- [7] Liao G Z, Zhang Y J, Xu X L, et al. Journal of Nanjing Agricultural University (廖国周, 张英君, 徐幸莲, 等. 南京农业大学学报), 2008, 31(4): 134
- [8] Zhang F, Lü Q F, Chu X G, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (张峰, 吕泉福, 储晓刚, 等. 分析化学), 2011, 39(4): 501
- [9] Wang M, Guo D H, Ding Z P, et al. Chinese Journal of Chromatography (王敏, 郭德华, 丁卓平, 等. 色谱), 2012, 30(7): 738
- [10] Naccari C, Galceran M T, Moyano E, et al. Food Chem Toxicol, 2009, 47(2): 321
- [11] Casal S, Mendes E, Fernandes J O, et al. J Chromatogr A, 2004, 1040(1): 105
- [12] Barcelo-Barrachina E, Santos F J, Puignou L, et al. Anal Chim Acta, 2005, 545(2): 209
- [13] Zhang F, Chu X G, Sun L, et al. J Chromatogr A, 2008, 1209: 220
- [14] Alaejos M S, Ayala J H, González V, et al. J Chromatogr B, 2008, 862: 15