

GCMS 测试食品中丙烯酰胺

徐嘉^{*1} 王学连 杨晓燕 郑建明 周立

江苏天瑞仪器股份有限公司, 江苏 昆山 215300

中图分类号: 0657.63 文献标志码: B

摘要: 本方法利用超纯水对食品中的丙烯酰胺进行 60℃ 振摇萃取, 试样提取液采用硅藻土柱萃取净化、溴试剂衍生后, 采用气相色谱-串联质谱仪选择离子监测(SIM)进行检测。采用特征离子定性, 响应值作为定量依据。外标法定量。结果表明最低检测限为 0.01mg/kg。

关键字: 丙烯酰胺; 萃取; 衍生; 选择离子

Abstract: This method is the use of ultra-pure water for acrylamide in food 60 °C shaking extraction, sample extracts using diatomaceous earth column extraction purification, after bromine reagent derived, using gas chromatography - tandem mass spectrometer selected ion monitoring (SIM) were testing. Characteristic ions using qualitative and quantitative basis as a response. External standard. The results show that the detection limit of 0.01mg / kg.

Keywords: acrylamide; extraction; derivative; selective ion

丙烯酰胺是一种白色晶体化学物质, 是生产聚丙烯酰胺的原料^[1]。淀粉类食品在高温 (>120℃) 烹调下容易产生丙烯酰胺。丙烯酰胺可见于吸烟、经高温加工处理的淀粉食品及饮用水中。易溶于水, 甲醇和乙酸乙酯等极性溶剂中。瑞典斯德哥尔摩大学和瑞典国家食品管理局研究人员率先报道, 从油炸薯条、薯片, 饼干等食品中检出了高浓度可疑致癌物-丙烯酰胺^[2,3]。

丙烯酰胺具有潜在的致癌性、神经毒性、遗传毒性和生殖毒性^[4]。人体可通过消化道、呼吸道、皮肤黏膜等多种途径接触丙烯酰胺, 其中以消化道吸收最快。进入体内后, 丙烯酰胺在细胞色素 P450 的作用下, 生成活性环氧丙酰胺。这种物质比丙烯酰胺更容易与 DNA 结合, 形成化合物, 导致细胞内遗传物质损伤和基因突变, 从而产生致癌作用。大量动物试验表明, 丙烯酰胺可致动物多脏器肿瘤, 包括乳腺、甲状腺、睾丸、肾上腺、中枢神经、口腔、子宫、脑下垂体等。国际癌症研究中心对丙烯酰胺的致癌性进行了评价, 将其列为二类致癌物, 即人类可疑致癌物。丙烯酰胺不仅是致癌物。根据最近卫生部公告提示^[5]: 职业接触人群的流行病学观察表明, 长期低剂量接触丙烯酰胺出现嗜睡、情绪和记忆改变、幻觉和震颤等症状, 伴随末梢神经病(手套样感觉、出汗和肌肉无力)。

¹ 徐嘉 1990 男 助理工程师

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

气相色谱质谱联用仪：GCMS6800（江苏天瑞仪器股份有限公司）；旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；振摇装置（SHA-B 双功能水浴恒温振荡器）；离心机：转速 $\leq 10\ 000$ r/m（凯特 TG16G 离心机）；漩涡混合器：QL-866（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；氮吹仪；固相萃取装置。

正己烷；乙酸乙酯；溴；氢溴酸溴化钾；超纯水；硅藻土柱：SLE-SPE 20g/60mL；标准品：丙烯酰胺（acrylamid）($\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$)（CAS:79061）：纯度 $>99\%$ 。

饱和溴水：量取100mL超纯水，置于200mL的棕色试剂瓶中，加入8mL溴，4℃避光放置8h，上层为饱和溴水溶液。

溴试剂：称取溴化钾20.0g，加超纯水50mL，使完全溶解，再加入1.0mL氢溴酸和16.0 mL饱和溴水，摇匀，用超纯水稀释至100 mL，4℃避光保存。

硫代硫酸钠溶液（0.1mol/L）：称取硫代硫酸钠2.48 g，加超纯水50mL，使完全溶解，用超纯水稀释至100mL，4℃避光保存。

饱和硫酸铵溶液：称取80g硫酸铵晶体，加入超纯水100mL，超声溶解，室温放置。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 气相色谱条件

色谱柱：DB-5, 30m*0.25mm,0.25 μm ；柱流量：1.0mL/min；不分流，进样体积 1 μL ；柱温：120℃保持 3min，以 30℃/min 速率上升至 240℃保持 10min；进样口温度：240℃；气质接口温度：240℃

1.2.2 质谱条件

离子源温度：230℃；溶剂切除时间：4min；扫描范围：full(35amu 至 300amu)，SIM 扫描离子： m/z 106、133、150 和 152，定量离子为 m/z 151

1.3 实验方法

1.3.1 样品提取

取约 50g 试样，经粉碎，-20℃冷冻保存。准确称取试样 2 g(精确到 0.001 g)，于具塞离心管中，加入超纯水 10mL，60℃下振荡 30min。

1.3.2 样品净化

在试样离心管中加入硫酸铵 15g，振荡充分溶解，于 4000r/m 离心 10min。将上清液倒入硅藻土柱中。并用少量超纯水清洗离心管一并倒入柱中。用 70mL 正己烷淋洗去油，控制流速为 2mL/min，弃去正己烷淋洗液。用 70mL 乙酸乙酯洗脱，控制流速为 2mL/min，收集乙酸乙酯洗脱溶液，并在 45℃ 水浴下减压旋转蒸发至近干，用乙酸乙酯洗涤蒸发瓶残渣三次（每次 1mL），并将其转移至已加入 1mL 超纯水的试管中，涡旋振荡。在氮气流下吹去上层有机相后，加入 1mL 正己烷，涡旋振荡，于 3500r/m 离心 5min，取下层水相备用衍生。

1.3.3 衍生

试样的衍生：在试样提取液中加入溴试剂 1mL，涡旋振荡，4℃ 放置至少 1h 后，加入 0.1mol/L 硫代硫酸钠溶液约 100 μ L，涡旋振荡除去剩余的衍生剂；加入 2 mL 乙酸乙酯，涡旋振荡 1min，于 4000r/m 离心 5min，吸取上层有机相转移至加有 0.1g 无水硫酸钠的试管中，加入乙酸乙酯 2mL 重复萃取，合并有机相；静置至少 0.5h，转移至另一试管，在氮气流下吹至近干，加 0.5mL 乙酸乙酯溶解残渣，用 0.22 μ m 针式滤头过滤，待测。

标准系列溶液的衍生：量取标准系列溶液各 1.0mL，按照上述试样衍生方法同步操作。

2 结果与讨论

2.1 特征和离子的选择

目标物经溴衍生化后，分子量增大，并且特征离子为 106、133、150、152，样品分析时基线较低，不易受杂质干扰。如图 1。

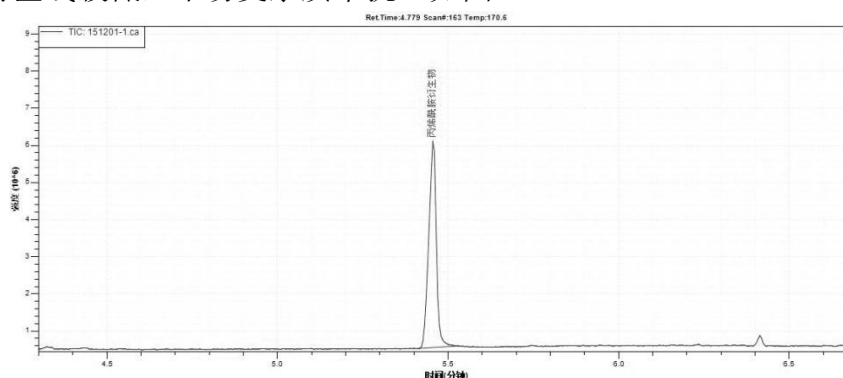


图 1 丙烯酰胺衍生物全扫描下总离子色谱图

Figure 1 acrylamide derivative under full scan total ion chromatogram

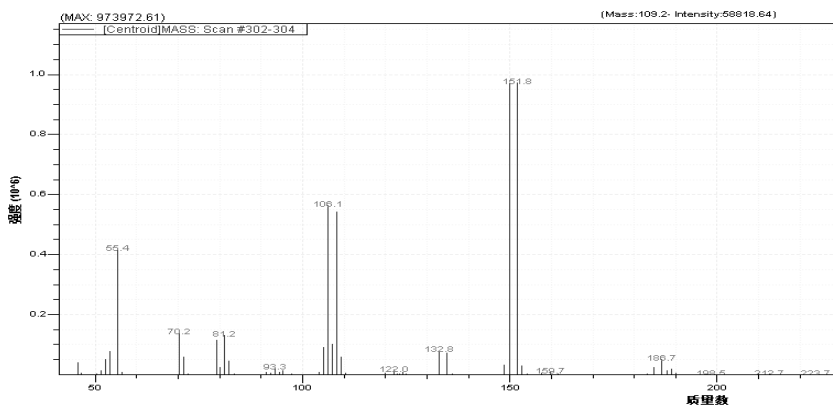


图2 丙烯酰胺衍生物质谱图
Figure 2 acrylamide derivative spectrum

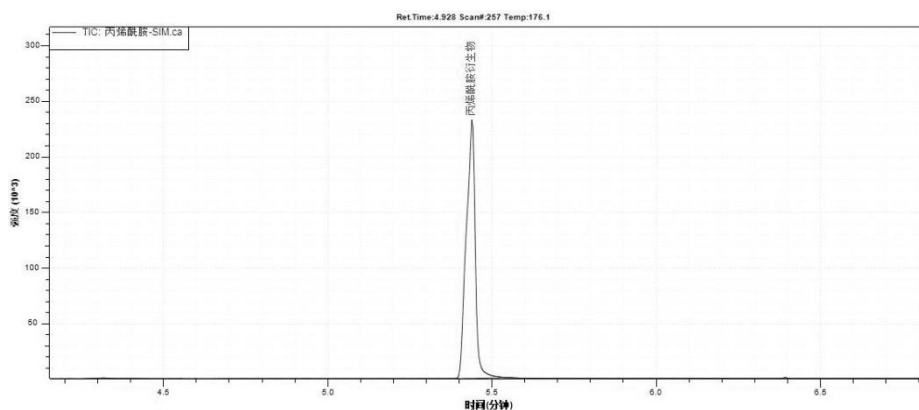


图3 丙烯酰胺衍生物 SIM 图
Figure 3 Figure SIM acrylamide derivative

2.2 色谱柱选择

丙烯酰胺属于极性化合物，不经衍生直接分析一般使用强极性色谱柱，HP-INNOWAX 或等效柱。而经衍生化后分析一般使用 DB-5 等弱极性色谱柱来分析。本次实验采用 HP-INNOWAX 和 DB-5 色谱柱来对比不同色谱柱的分析效果。而又因为使用弱极性色谱柱分析必须经过衍生化，所以同时对比强极性柱衍生化与未衍生化的分析效果。

GCMS 分析条件：色谱柱：HP-INNOWAX，30m*0.25mm,0.25 μ m；DB-5 30m*0.25mm,0.25 μ m；柱流量：1.0mL/min；不分流，进样体积 1 μ L；柱温：120 $^{\circ}$ C 保持 3min，以 20 $^{\circ}$ C/min 速率上升至 200 $^{\circ}$ C 保持 10min；进样口温度：200 $^{\circ}$ C；气质接口温度：200 $^{\circ}$ C；离子源温度：230 $^{\circ}$ C；溶剂切除时间：4min；扫描范围：FuLL (35amu 至 300amu)；使用强极性柱，5ppm 标样直接进样分析的结果如下：

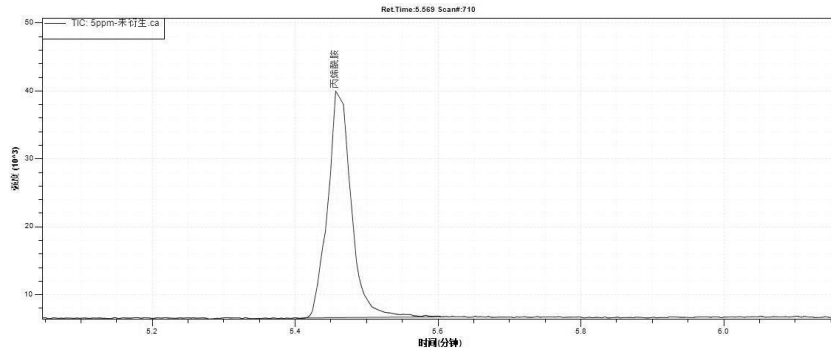


图 4 5ppm 下丙烯酰胺色谱图
Figure 4 5ppm acrylamide chromatogram

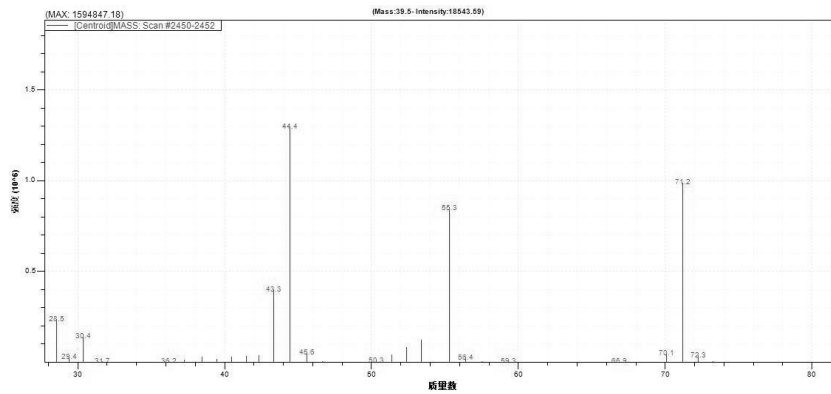


图 5 丙烯酰胺质谱图
Figure 5 acrylamide spectrum

标准样品经衍生化后使用 INNOWAX 色谱柱的情况如下：

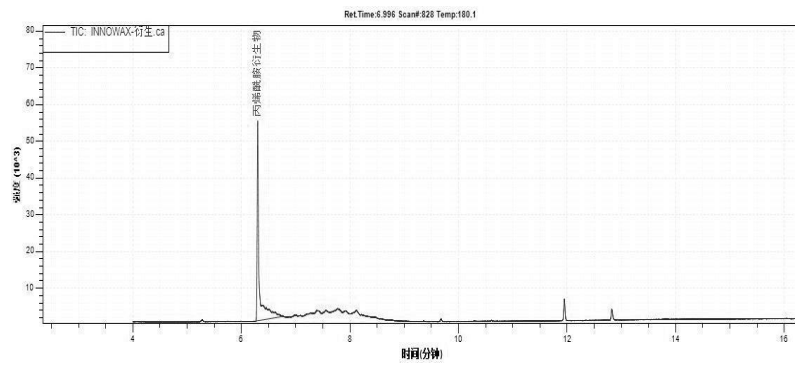


图 6 HP-INNOWAX 色谱柱丙烯酰胺的衍生物色谱图

Figure 6 HP-INNOWAX column acrylamide derivatives chromatogram

标准样品经衍生化后使用 DB-5 色谱柱的情况如下：

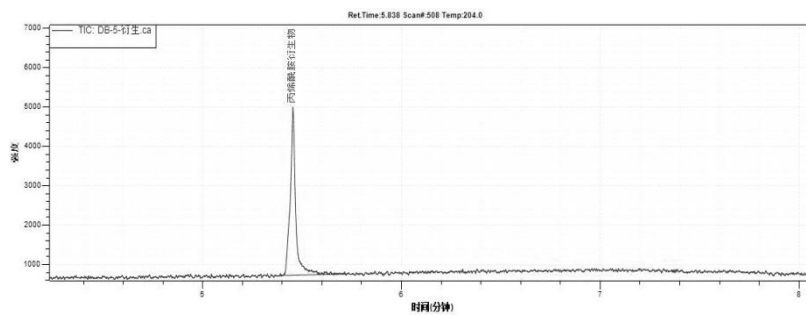


图 7 DB-5 色谱柱丙烯酰胺的衍生物色谱图

Figure 7 DB-5 column acrylamide derivatives chromatogram

通过对比可看到，使用强极性柱直接进样，目标物强度较高，峰型较好，灵敏度也较好。经衍生化后的强极性柱分析，物质有严重拖尾，且经过各参数调整都不能消除。原因是目标物衍生后极性变弱，色谱柱不易保留。使用 DB-5 弱极性柱，峰形较好，但相同浓度，目标物强度不高。理论上使用强极性柱直接进样分析效果会更好一些，其实不然。丙烯酰胺分子量较低，只有 71，在分析中产生碎片离子 44、55，在实际样品分析中很容易受样品杂质干扰，方法检出限并不高，并且回收率效果很不好。目标物经溴衍生化后，分子量增大，并且特征离子为 106、133、150、152，样品分析时基线较低，不易受杂质干扰。最终决定使用目标物经衍生，使用弱极性色谱柱 DB-5。

3 实验数据

3.1 精密度和重复性实验

取丙烯酰胺标液 5ppm 溶液，分别取六份，以上述衍生化方法处理，进样分析。考察目标物保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD)，其数据如表 1 所示，六针平行样的谱图如图 8 所示。

表 1 丙烯酰胺的重复性测试

Table 1 acrylamide repeatability test

目标物		1	2	3	4	5	6	平均值	RSD(%)
丙烯酰胺	峰面积	8254	8426	8172	8899	7508	8625	8314	5.7
	停留时间	5.453	5.438	5.438	5.438	5.388	5.382	5.453	0.5

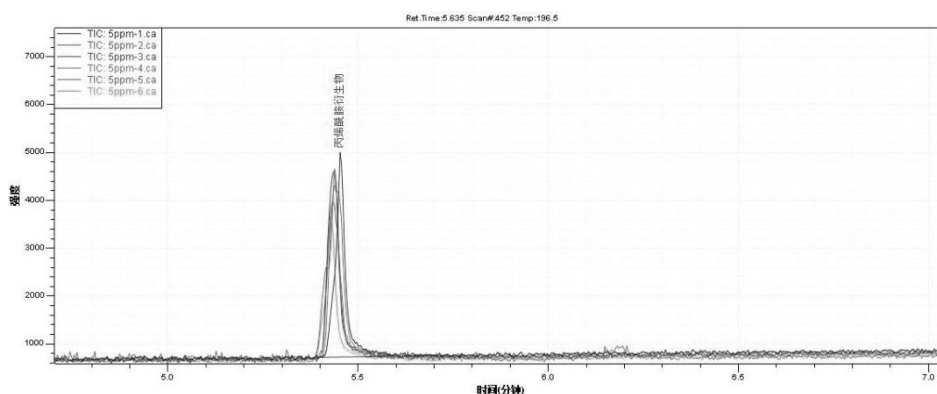


图 8 丙烯酰胺重复性测试

Figure 8 acrylamide repeatability test

3.2 线性关系和检出限

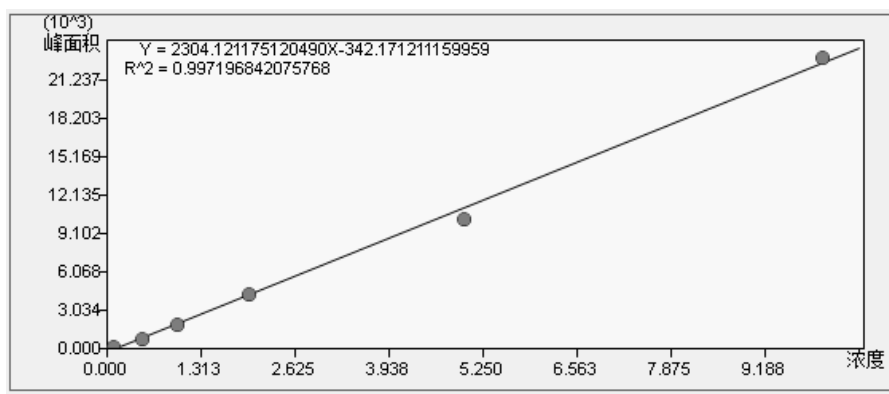
配制标准系列溶液中丙烯酰胺浓度分别为 0.5mg/L、1mg/L、2mg/L、5mg/L、10mg/L，衍生化后进行气相色谱质谱分析。根据目标化合物的峰面积及其含量，

建立相应工作曲线，检测其线性。以 3 倍信噪比做其检出限。其数据如下表 3 所示。可以看到，相关系数较高，且检出限比较低。

名称	线性方程	线性相关系数	最低检测限 mg/L
丙烯酰胺	$y = 2304.1x - 342.2$	0.9972	0.01

表 2 丙烯酰胺线性及检出限

Table 2 linear acrylamide and detection limit



3.3 回收率实验

以某品牌小面包做基质，考察在不同加标水平下的回收率。加标分别为 $1\mu\text{g}$ 、 $5\mu\text{g}$ 。测试结果如下表所示：

表 3 丙烯酰胺不同加标水平下的回收率

Table 3 Recovery of acrylamide levels under different spiked

目标物	$1\mu\text{g}$		$5\mu\text{g}$	
	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
丙烯酰胺	98.1	3	104.6	2

可以看到，回收率比较良好。

4 参考文献

[1] GB 5009.204-2014 食品安全国家标准 食品中丙烯酰胺的测定

[2]Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, et al. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs[J]. J Agric Food Chem, 2002.50: 4998-5006.

[3]Roson J, Heuvelink KE. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Anal, 2002, 127: 880-882.

[4]宋雁. 丙烯酰胺不仅是致癌物[N]. 健康报, 2005-12-6.

[5]中华人民共和国卫生部公告[Z]. 2005 年第 4 号.