

基于气相色谱三重四极杆串联质谱进行大米中 2-乙酰-1-吡咯啉含量测定

陈青^{1,2}, 肖湘女^{1,2}, 张丽娜^{1,2}

(1.中国农业科学院作物科学研究所 重大平台中心, 北京 100089; 2.中国仪器仪表学会科学仪器设备验证评价中心(生命科学站), 北京 100089)

摘要: 本研究建立了一种基于气相色谱串联质谱法测定大米中 2-乙酰-1-吡咯啉的方法。以 2,4,6-三甲基吡啶作为内标, 通过内标法进行定量。结果显示, 2-AP 在 0.1-0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度区间内标准曲线线性关系良好, 相关系数大于 0.99, 检出限为 0.0377 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加标回收率在 98.05%-106.50%之间。结果表明, 该方法精密度、重复性较高, 适用于大米中 2-AP 含量的定量检测, 有利于对于大米品质的评价和分级, 可以为大米香气物质分析提供技术支持。

关键词: 气相色谱三重四极杆串联质谱;大米;2-乙酰-1-吡咯啉

Determination of 2-acetyl-1-pyrroline content in rice based on gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry

Chen Qing^{1,2}, Xiao Xiangnv^{1,2}, Zhang Lina^{1,2}

(1. Major Platform Center, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100089, China; 2. Scientific Instruments and Equipment Verification and Evaluation Center of China Instruments and Apparatus Society (Bioscience Station))

Abstract: This study established a method for the determination of 2-acetyl-1-pyrroline in rice based on gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry. Using 2,4,6-collidine as an internal standard, the quantification was performed by the internal standard method. The results showed that the standard curve of 2-AP had a good linear relationship in the concentration range of 0.1-0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the correlation coefficient was greater than 0.99, the detection limit was 0.0377 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the recovery rate of standard addition was between 98.05% and 106.50%. The results show that the method has high precision and repeatability, and is suitable for the quantitative detection of 2-AP content in rice, which is beneficial to the evaluation and

classification of rice quality, and can provide technical support for the analysis of rice aroma substances.

Keywords: gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry; rice; 2-acetyl-1-pyrroline

1 实验背景

大米作为全世界人口食用的主食之一，是世界上 39 个国家，约 12 亿人口的主要日常主食，人类的食物热量有 23%来自稻米^[1]。随着我国产业结构的调整，大众消费观念和品质意识的提升，消费者对高品质食物的需求逐渐增强，除了对大米食品安全特性的关注之外，消费者对大米风味和口感的要求也越来越高，其中蕴含的经济价值也渐渐体现^[2]。大米的风味是评价大米品质的主要因素之一，研究表明，大米的香味由多种挥发物组成，包括烃类、芳烃类、醛类、酮类、酯类、酸类、醇类、烯及烯醇类、杂环化合物等^[3]，2-乙酰-1-吡咯啉(2-acetyl-1-pyrroline,2-AP)是目前研究最多的大米特征性香气成分^[4]，是区别香型和非香型大米的标志物质^[5]，其香气阈值仅有 0.000053mg/kg^[6]。对大米中的 2-AP 进行准确的定量分析，有利于对于大米品质的评价和分级，对商家和消费者而言，都有重要的引导意义。

目前对大米中的 2-AP 的提取方法主要包括水蒸馏法、同时蒸馏萃取法、溶剂萃取法以及固相微萃取法^[7]，有研究表明，Sugunya 等^[8]采用水蒸馏法提取了考道马里 105 糙米中包含 2-AP 在内的 140 种挥发化合物，并对 2-AP 等挥发物进行了相对定量分析，但是在蒸馏过程中，随水蒸气蒸发的 2-AP 需要经过冷凝管冷凝后收集，前处理过程耗时较长是水蒸馏法的一个弊端。同时蒸馏萃取法(simultaneous distillation extraction,SDE)是将水蒸气蒸馏和溶剂萃取合二为一的方法，SDE 法相比蒸馏法，在减少冷凝时间的同时，也降低了 2-AP 在转移过程中的损失，但是 SDE 法提取温度较高，可能会造成 2-AP 的损失。溶剂萃取法是利用大米样品中包含 2-AP 的各组分在溶剂中的溶解性质差异而达到分离的效果，溶剂萃取法操作温度低，相比蒸馏法和同时蒸馏萃取法，减少了 2-AP 在萃取过程中的降解，操作方便。但有时受基质影响严重，可能造成结果失真。固相微萃取法(Solid Phase Micro Extraction,SPME)是基于涂有固定相的熔融石英纤维来吸附、富集样品中待测物质的一种前处理方法。SPME 法的萃取效果除受样品基质影响外，还可能受纤维涂层类型、萃取温度、萃取时间等多因素的影响。

仪器分析方法主要包括气相色谱及气相色谱-质谱法、气相色谱-嗅觉测试法，以及最新

被开发出来的衍生化-高效液相色谱-串联质谱法,包括 GC、GC-MS、GC-O-MS、GC-TOF-MS、GC×GC-TOF-MS、HPLC-MS/MS 等仪器^[1]。GC 常用的检测器有火焰离子化检测器 (Flame Ionization Detector,FID) 及氮磷检测器 (Nitrogen Phosphorus Detector,NPD)。GC 法相比于其他方法本身灵敏度低,且 GC 在分离时,样品基质中与 2-AP 性质相似的物质可能会与 2-AP 共流出,会对测定结果的准确性造成很大影响。与 GC 分离分析相比,高效液相色谱不需要温度较高的前处理过程,对待测物的沸点、热稳定性等要求较低,对 2-AP 的检测结果更准确。但是 GC 相关技术由于前处理简单,且可同时分析大米中其他化合物包括 2-AP 等,仍然是分析 2-AP 的主流技术。GC-MS 在检测 2-AP 时,相比 FID 及 NPD 等检测器,质谱检测器的灵敏度更高、定性能力更强,因此 GC-MS 比 GC 更适于大米中 2-AP 的测定。然而相比 GC-MS,GC-MS/MS 的检测灵敏度更高,更加适合对微量及痕量水平挥发物的分析,在采用 GC-MS/MS 分析时,除了标准品和保留时间,基于全扫描条件下 2-AP 的碎片离子丰度特征以及 NIST 标准谱库中 2-AP 的碎片离子都可以对 2-AP 进行定性^[2]。GC-MS/MS 的灵敏度和稳定性相比 GC-MS 更高,且能够在单粒大米水平分析 2-AP 的含量,对于样品珍贵的育种试验意义显著,对于促进香米育种、建立痕量检测 2-AP 的标准也都有重要意义。GC-TOF-MS 相比于其他仪器更适于 2-AP 的相关机制分析,如 2-AP 生成前体及产物的分析和鉴定等,不适合单纯建立 2-AP 的定量方法^[5]。

本实验选择溶剂萃取的前处理方法,选择 2,4,6-三甲基吡啶为内标,乙醇和二氯甲烷作为萃取溶剂开展实验,基于气相色谱三重四极杆串联质谱(谱育科技 EXPECT 5231)通过内标法进行了大米中 2-AP 含量的测定,取得了良好的实验效果,为今后利用气相色谱三重四极杆串联质谱法开展更多大米中的风味物质的测定实验提供了参考依据。

2 实验方法

2.1 试剂及仪器

无水乙醇和二氯甲烷,2,4,6-三甲基吡啶(2,4,6-trimethylpyridine TMP, 纯度>99%, sigma); GC-MS/MS 5231 (中国,杭州谱育科技发展有限公司),离心机。

2.2 2-AP 提取

采用无水乙醇和二氯甲烷作为提取溶剂对大米中 2-AP 进行提取。

2.3 仪器条件

(1) 色谱条件: 色谱柱为 DB-WAX 毛细管柱: 30m*0.18mm *0.25um; 柱温升温程序为 60 °C 保持 2min, 10°C/min 升至 100°C, 然后以 30°C/min 升至 230°C, 保持 5min; 进样口压力为 78.0kPa, 进样口温度为 180°C; 载气为高纯(纯度>99.999%)氦气; 恒压不分流进

样，进样量为 1 μ L。

(2) 质谱条件：电子轰击(EI)离子源，离子源温度为 200 $^{\circ}$ C；离子化能量为 70eV；接口温度为 220 $^{\circ}$ C；检测器电压为 0.1KV，全扫描方式，扫描范围为 m/z35~500。

2.4 定性分析

按照上述仪器条件进行分析，在 GC-MS/MS 上扫描样品得到 TIC 谱图，进入 NIST 谱库对所得峰进行相似度检索，确定 TMP 和 2-AP 的峰。

2.5 定量分析

按照上述 GC-MS 条件进行 Scan 扫描，获得总离子流图，对所得峰积分并相似度检索，并进行定性分析，得知 TMP 和 2-AP 的峰面积，进行计算 2-AP 的浓度。

3 实验结果

3.1 标准品和样品 TIC 图

将 2-AP 和 2,4,6-三甲基吡啶(TMP，内标)按照上述仪器条件进样检测，结果如图 1、图 2 所示。2-AP、TMP 标准品保留时间分别为 9.43min、10.26min，样品中 2-AP、TMP 保留时间分别为 9.42min、10.25min。样品和标准品中 2-AP、TMP 保留时间一致。

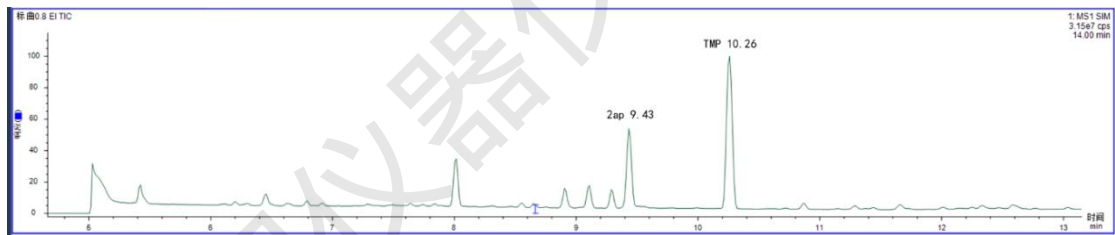


图 1 2-AP 及 TMP 标准品 TIC 图

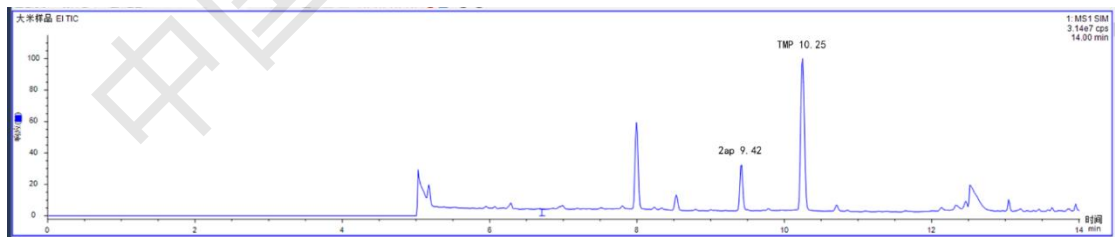


图 2 大米样品 2-AP 提取物 TIC 图

3.2 线性关系

用乙醇作为溶剂将 2-AP 和 TMP 标准品进行稀释，配制成 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 μ g/mL 的系列浓度标准溶液，各浓度梯度标液中含有 TMP 浓度为 1.25 μ g/mL，在上述分析条件下，以 2-AP 特征离子峰面积与 TMP 特征离子峰面积之比为纵坐标，以 2-AP 浓度为横坐标进行线性回归计算，选择产生 3 倍色谱响应信噪比(S/N=3)的低浓度标准溶液来计算检出限。由

图 3 可知，该方法在 0.1-0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好，曲线拟合度 $R^2 > 0.99$ ，方法检出限为 0.0377 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

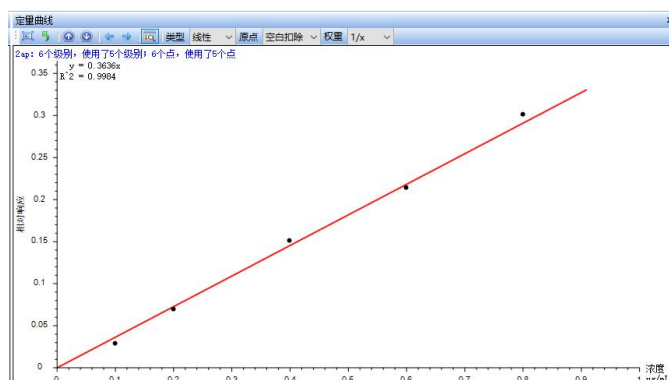


图 3 2-AP 标准曲线

3.3 准确度和精密度

对样品进行目标化合物 2-AP 的 3 个质量浓度水平的加标回收试验，3 次加标回收率测定结果为 98.05%、103.30%、106.50%，满足质量控制回收率在 80%~120%之间的要求。对 2-AP 标准品进行平行测定 10 次，考察仪器精密度，由表可知，平行测定 10 次所得 2-AP 峰面积 RSD 为 3.95%，浓度 RSD 为 3.81%，均小于 5%，说明仪器精密度良好。

表 1 同一标准品重复测定 10 次结果

样品信息	2-AP				TMP		
	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度	保留时间	峰面积	计算浓度
1	9.43	2408236	0.05	0.16	10.26	52960810	1.25
2	9.41	2293731	0.04	0.15	10.25	52571070	1.25
3	9.42	2275164	0.04	0.15	10.26	52644300	1.25
4	9.42	2385977	0.05	0.16	10.25	52731100	1.25
5	9.41	2287557	0.04	0.15	10.25	52364560	1.25
6	9.42	2232349	0.04	0.15	10.25	52691000	1.25
7	9.4	2143855	0.04	0.14	10.25	52958900	1.25
8	9.41	2229620	0.04	0.15	10.24	52300140	1.25
9	9.42	2436524	0.05	0.16	10.25	53049000	1.25
10	9.42	2346025	0.04	0.15	10.26	52516840	1.25
RSD	0.11	3.95	3.81	3.81	0.07	0.48	0

3.4 重复性

为了考察该方法重复性,选择同一大米样品,平行制备6份样品溶液,上机进行测试。结果如表,6份平行样之间2-AP峰面积RSD为,小于5%。说明该方法重复性良好。

表2 平行制备6份样品测定结果

样品信息	2-AP			
	保留时间	峰面积	相对峰面积	计算浓度
大米1	9.4	9090890	0.19	0.53
大米2	9.44	9982248	0.19	0.54
大米3	9.41	9033809	0.21	0.58
大米4	9.41	9148459	0.21	0.59
大米5	9.4	8900281	0.19	0.53
大米6	9.43	9664971	0.19	0.53
RSD	0.21	4.55	4.97	4.97

4 结论

本文基于谱气相色谱三重四极杆串联质谱建立了一种大米中2-AP含量测定的方法,该方法检出限低、结果精密度和准确度良好,能够满足大米中2-AP含量测定的需求,同时为农作物中香气物质含量的测定提供参考依据。随着检测技术的不断发展,近来研究发现2-AP并不是造成香米与非香米风味差异的唯一物质,例如戊醛、己醛、2-戊基呋喃、2,4-壬二烯醛、吡啶、1-辛烯-3-醇和E-2-辛烯醛是造成印尼香米和非香米品种差异的主要原因^[13]。大米是全球最重要的主食之一,大米香气是大米中挥发性风味物质所呈现的整体香气和人类感官感知的综合结果,是大米品质的重要组成部分,也是影响消费者对大米可接受程度的主要因素^[14]。探究不同品种大米的关键挥发性风味物质,可以进一步提高关键挥发性风味物质基因调控途径、生长代谢途径,从而改良大米品种或筛选大米优良加工原料^[15]。本次实验应用气相色谱三重四极杆串联质谱进行大米中2-AP检测只是对大米中风味物质检测的初步尝试,气相色谱三重四极杆串联质谱方法在测定大米中其他风味物质组分检测上持续发挥其突出的优势,甚至将其应用于更多食品和农产品的风味物质检测,将是我们持续努力探索的方向。

参考文献:

[1] 李科静. 大米中霉菌的微波杀菌工艺及机理研究[D]. 吉林:吉林大学, 2015.

- [2] 刘敏. 贵州优质稻感官品质相关性研究[D]. 贵州大学, 2018.
- [3] YUN D,ZHONG Y,YU W J,et al.Effect of hydrostatic high pressure pretreatment on flavor volatile profile of cooked rice[J].Journal of Cereal Science,2013,58(3):479-487.
- [4] MA R R,TIAN Y Q,ZHANG H H,et al.Interactions between rice amylose and aroma compounds and their effect on rice fragrance release[J].Food Chemistry,2019,289(8):603-608.
- [5] 梁奕,庄海宁,冯涛,等. 大米及其衍生食品风味物质的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(01): 41-49.
- [6] 里奥·范海默特. 化合物嗅觉阈值汇编第二版[G], 2018.
- [7] 刘洪斌,段晓亮,李颖,赵璐瑶.大米中 2-乙酰基-1-吡咯啉检测技术及形成机制研究进展[J]. 粮油食品科技,2022,30(05):227-233.
- [8] SUGUNYA M,KEAWSAAD,DUMRI K.Quantification of the rice aroma compound,2-Acetyl-1-Pyrroline,in uncooked khao dawk mali 105 brown rice[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2001,49(2):773-779.
- [9] BUTTERY R G,LING L C,JULIANO B O,et al.Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline[J].Journal of Agricultural&Food Chemistry,1983,31(4):823-826.
- [10] HIEN N L,YOSHIHASHI T,SARHADI W A,et al.Sensory test for aroma and quantitative analysis of 2-Acetyl-1-Pyrroline in Asian aromatic rice varieties[J].Plant Production Science,2006,9(3):294-297.
- [11] 胡亚微,杨洋,彭锦峰. 香米特征香味成分 2-乙酰基-1-吡咯啉提取及检测方法研究进展 [J]. 色谱 ,2020, 38(07).
- [12] SUGUNYA W,SRISEADKA T,CHOONVISASE S.Identification and quantitation of the rice aroma compound,2-Acetyl-1-pyrroline,in bread flowers (vallis glabra ktze)[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2003,51(2):457-462.
- [13] Widiastuti S, Tomasz M, Tomasz D, et al. Key-Marker Volatile Compounds in Aromatic Rice (Oryza sativa) Grains: An HS-SPME Extraction Method Combined with GC×GC-TOFMS[J]. Molecules, 2019, 24(22): 4180.
- [14] 彭凯雄,唐群勇,郑钰涵,等. 大米中挥发性风味物质的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(15): 4794-4801.
- [15] 梁奕,庄海宁,冯涛,等. 大米及其衍生食品风味物质的研究进展[J]. 粮油食品科

技,2021,29(1):41-49.

中国仪器仪表学会