

丙烯酰胺样品前处理及其检测方法研究进展

孙秀兰, 纪剑, 安璐, 张银志

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 综述了食品加工过程中产生的具有神经毒性和潜在致癌性的主要有害物质丙烯酰胺的样品前处理技术, 及其气相色谱法、液相色谱法及离子色谱法等检测方法的研究进展。

关键词: 丙烯酰胺; 样品前处理; 检测方法

中图分类号: TS 207.5 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)05—0456—04

Acrylamide Sample Preparation and Detection Method Research Progress

SUN Xiu-lan, JI Jian, AN Lu, ZHANG Yin-zhi

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214063, China)

Abstract: Acrylamide is a kind of nerve toxicity and potential carcinogenicity material, which is one of the main harmful substances during food processing process. This review summarizes the progress of the acrylamide sample pretreatment technology and detection methods, including gas chromatography, liquid chromatography and ion chromatography technology.

Keywords: acrylamide, sample pretreatment technology, detection method

丙烯酰胺 (acrylamide), 是一种有毒的无色、无味透明固体结晶, 沸点为 125 °C, 熔点为 84~85 °C, 室温下稳定, 熔融或暴露在紫外光下以及氧化条件下易发生聚合反应产生聚丙烯酰胺。动物实验和体外实验证明, 丙烯酰胺可导致遗传物质改变和癌症。其主要源于薯条薯片, 炸透的薯片中丙烯酰胺含量高达 12 800 µg/kg。JECFA 根据各国丙烯酰胺摄入量, 认为人平均摄入量约 0.001 mg/(kg·d)^[1]。且我国将食品中丙烯酰胺的检验列为“十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术”课题, 卫生部食品安全计划也将食品中丙烯酰胺检测方法的建立和我国食品丙烯酰胺分布调查作为一个重要内容。目

前食品中丙烯酰胺的测定方法主要采用色谱法, 尤其是色谱联用技术大大提高了测定的灵敏度和准确度, 已成为国际关注的检测技术。作者就近年来国内外应用较多、有良好前景的样品前处理及检测方法作一简要综述。

1 丙烯酰胺样品前处理技术

食品中丙烯酰胺的分析通常需经过样品提取、纯化富集、分离检测等步骤, 样品前处理是核心, 它对保证测定结果的准确性和可靠性、提高检测效率具有重要的影响, 主要包括提取、衍生和净化等步骤。提取指使用适当溶剂将待测物连同样品基质从

收稿日期: 2013-03-19

基金项目: 国家 973 计划项目(2012CB720804); 2010 年度公益性行业(农业)科研专项(201003008-08); 2012 年度公益性行业(农业)科研专项(201203069)。

作者简介: 孙秀兰(1976—), 女, 山东聊城人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测方面的研究。E-mail: sxlzz@jiangnan.edu.cn

固态样品中转移至易于净化和分析的液态;净化指将待测物与提取液中的干扰物质分离,在有些方法中提取和净化一步完成,而对于某些复杂样品,提取后往往还需净化才能达到待测物与干扰杂质分离。另外,一些检测方法需要将样品衍生化,从而改善丙烯酰胺的分离度和灵敏度。

1.1 液-液萃取

水是目前应用最广泛的萃取溶剂,因为丙烯酰胺在水中的溶解度最大,对于大多数食品样品萃取完全。丙烯酰胺在酸性溶液中更加稳定,美国FDA建议用含体积分数0.1%的蚁酸水溶液萃取样品^[2]。而且为了追求样品的高回收率和避免样品前处理过程中乳化现象产生,经常在萃取前加入一定量的NaCl水溶液,以达到破乳的目的^[3]。近年来加速溶剂萃取(ASE)的方法被广泛地应用于复杂样品的前处理过程,其突出优点是溶剂用量少、快速、基体影响小、萃取效率高、选择性好^[4]。

王海波^[5]以10 mmol/L甲酸溶液与乙腈体积比7:3混合为提取溶液,精密称取待测丙烯酰胺样品5 g,加提取溶液50 mL使充分溶解混匀,室温30℃下振荡1 h后取出静置10 min以沉淀不溶物质。取上清液5 mL,经过0.22 μm尼龙滤膜和On Guard RP柱过滤,滤液直接上机分析。对于脂肪含量高的样品,可采用有机溶剂萃取。

加速溶剂萃取技术(ASE)是一种在提高温度(50~200℃)和压力(10.3~20.6 MPa)的条件下,利用有机溶剂萃取固体或半固体的样品前处理方法。其优点是溶剂用量少、快速、基体影响小、选择性好、萃取效率高。Cavalli^[6]等人以水作为提取溶剂,采用加速溶剂萃取技术得到MS的检测限为10~1 000 μg/mL。同时瑞士公共安全部门也提出了采用ASE提取食品中的丙烯酰胺的方法。

1.2 固相微萃取

固相微萃取(SPME)是集采集、萃取、浓缩、进样于一体的样品处理新技术,可与GC-MS、HPLC-MS等联用^[7]。近年来在食品中挥发性有机物的检测方面得到了广泛应用。分子印迹技术是根据模板分子与聚合物单体接触时会尽可能地同单体形成多重作用点,通过聚合,把这些多重作用点固定或“冻结”,当模板分子除去后,聚合物中就形成了与模板分子在空间和结合位点上相匹配的具有多重作用点的空穴,这样的空穴对模板分子具有选择性。

权英^[8]等以丙烯酰胺的结构类似物丙酰胺为模板分子,采用本体聚合法制备出了对丙烯酰胺具有较好选择性的印迹聚合物。静态吸附平衡实验和Scatchard分析结果表明,与非印迹聚合物相比,印迹聚合物对丙烯酰胺具有较强的吸附特性,最大吸附量为4.283 mg/g。JIANG Dong-lei^[9]通过在硅胶表面构建的丙烯酰胺分子印迹物(MIP)作为填充材料自制SPE柱,进行丙烯酰胺样品前处理。制备的MIP-SPE小柱用于薯条样品前处理,平均回收率为93.5%,RSD值为2.24%。与C18-SPE柱的特异性吸附比较,其制备的MIP-SPE柱具有极好的选择性,通过与HPLC的结合,可用于食品样品中丙烯酰胺的快速检测。JI Jian^[10]通过表面引发原子自由基聚合在石墨烯表面构建丙烯酰胺分子印迹物,印迹物的吸附能力为123.48 μmol/g,应用于薯条样品前处理,平均回收率为93.7%,RSD值为4.71%。

2 丙烯酰胺检测方法

由于食品的组成成分复杂,而且丙烯酰胺的含量很低,国外普遍采用的食品中丙烯酰胺的分析方法主要有气相色谱法、液相色谱法,特别是液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等检测方法,准确性和灵敏性均相应提高,是具有潜在发展前景的检测方法。

2.1 气相色谱-质谱联用法(GC-MS)

由于丙烯酰胺的热不稳定性,采用GC进行检测时,需要对其进行化学衍生,以改善丙烯酰胺的热不稳定性,提高GC检测方法的灵敏度与专一性。目前,衍生化方法主要为溴化衍生,衍生产物为2,3-二溴丙酰胺或是2-溴丙烯酰胺^[11]。

程劼^[12]通过气相色谱-串联四极杆质谱(GC-MS/MS)结合两步衍生法检测经样品前处理的丙烯酰胺样品。采集的样品经正己烷萃取,10 000 r/min转速离心,过滤,滤液通过C18 SPE净化淋洗。净化后的丙烯酰胺样品通过KBr, HBr和饱和溴水进行初步衍生化,然后滴加硫代硫酸钠至衍生液褪色,通过乙酸乙酯萃取,过滤。色相色谱条件:TR-5毛细管气相色谱柱,柱温程序:起始温度70℃,保持1 min,以15℃/min的速率升温至280℃,保持10 min;进样量1 μL。四级杆串联质谱条件:采用离子反应监测模式(SRM),检测定性离子对 m/z 152 > 135和 m/z 152 > 107,定量离子 m/z 152 > 135,碰撞

气体氩气能量 15 eV。其在 3.0~30 ng/g 质量分数内呈现良好的线性关系, 丙烯酰胺的检出限 (LOD) 为 1.0 ng/g ($S/N=3$)。郭志峰^[13]建立了一种测定市售锅巴中的丙烯酰胺含量的方法。该法样品前处理不必经过溴化衍生, 样品脱脂后用水提取丙烯酰胺, 提取液过活性炭柱, 再用乙酸乙酯将活性炭柱中吸附的丙烯酰胺洗脱, 洗脱液浓缩后经气相色谱-质谱 (GC-MS) 定量分析, 检测限 (LOD) 为 0.06 mg/kg。

2.2 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)

由于 GC 测定样品中丙烯酰胺需进行溴化衍生, 操作繁琐, 对衍生技术要求较高, 难以掌握。采用 LC 方法不需要衍生, 直接对丙烯酰胺进行测定, 简化了分析过程, 而且测定在常温下进行, 克服了热不稳定性^[14]。

程江华^[15]通过液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定食品样品中的丙烯酰胺含量, 采用的色谱柱为 Atlantis TM C18, 质谱条件为 ESI+ 模式, 毛细管电压 2.5 kV, 丙烯酰胺定性离子 (72/55), 碰撞能量 5 eV。其平均回收率为 92.73%, RSD 为 1.46%, 检测范围 25~1 600 ng/mL, 检出限 (LOD) 9.0 ng/mL ($S/N=3$)。Renzo Bortolomeazzi^[16]通过 SPE 柱 (填充物: 自制 C18 材料、强阳离子 (SCX) 和阴离子交换 (SAX) 吸附剂) 对咖啡样品进行前处理, 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定丙烯酰胺含量。通过氘 d3 标记的丙烯酰胺做内标, 对 6 种咖啡样品进行测定, 其 RSD 值为 5%, 最低检出限 (LOD) 为 5 $\mu\text{g/kg}$, 定量限 (LOQ) 为 16 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.3 高效液相色谱 (HPLC-CWO) 和气相色谱 (GC- μECD) 分析方法

已有报道利用气相色谱-质谱联用法 (GC-MS), 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定食品中的丙烯酰胺, 两种方法对仪器的要求都很高, 不适合在普通实验室中推广。

张辉珍^[17]建立了食品中丙烯酰胺的高效液相色谱 (HPLC-CWO) 和气相色谱 (GC- μECD) 分析方法。其优化了前处理步骤和仪器分析条件, HPLC 分析方法采用体积分数 0.1% 甲酸溶液提取, 石墨化碳黑固相萃取小柱净化, 甲醇和乙酸铵 体积比 5:3 作为流动相测定, 其最低检出限 (LOD) 为 0.01 mg/kg, 定量限 (LOQ) 为 0.05 mg/kg。GC- μECD 法则是在强酸体系中, 用 0.1 mol/L KBrO₃ 和 KBr 对丙烯酰胺进行加成反应衍生化, 乙酸乙酯提取衍生化产物 α ,

β -二溴丙酰胺, 用 HP-FFAP 毛细管柱分离, 电子捕获检测器检测, 最低检出限 (LOD) 0.005 mg/kg, 定量限 (LOQ) 为 0.02 mg/kg。

2.4 离子色谱-质谱联机检测法

王海波^[15]建立了使用离子色谱串联质谱测定食品中丙烯酰胺离子的检测方法。样品经过前处理后, 通过离子排斥色谱进行分离, 质谱进行定性并进行定量计算。以 IonPac AS1 分析柱进行离子排斥分离。ESI-MS 以选择离子模式对目标离子进行监控, 以 SIM 离子 72 的峰面积进行定量计算。该方法对丙烯酰胺的检出限 ($S/N=3$) 为 5 $\mu\text{g/L}$, 丙烯酰胺在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内具有良好的线性, 线性相关系数 $r=0.999\ 6$ 。程喜明^[18]通过使用离子色谱测定油炸食品中丙烯酰胺, 样品前处理方法与 FDA 提供的方法大致相同。经超声、离心后上清液用离子色谱-紫外检测器检测, 通过 IonPac ICEAS1 (4 mm $\times$ 250 mm) 分离柱, IonPac NG1 (2 mm $\times$ 250 mm) 保护柱, 紫外检测波长为 202 nm。结果表明其对 3 种样品的加标回收率在 80% 以上, RSD < 5%, 最低检出限 (LOD) 为 0.010 mg/kg, 相对偏差 < 20%。

3 前景展望

不同的前处理技术有其各自的适用范围和优缺点, 在实际工作中, 应根据待测样品的种类和基质、测定结果要求和检测仪器的不同, 并结合实际条件选用合适的样品前处理方法。固相微萃取、加速溶剂萃取、基质固相分散等新技术具有广泛的应用空间。

目前食品中丙烯酰胺的卫生标准尚未建立, 各国正广泛开展食品中丙烯酰胺的研究, 尝试了多种方法测定食品中丙烯酰胺, 见诸报道的有气相色谱法 (GC), 液相色谱法 (LC), 气相色谱-质谱联用法 (GC-MS), 液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 等, 但是这些方法在分析时间、成本及普及性方面各有长短, 其最大的问题在于仪器昂贵, 样品前处理方法复杂繁琐, 成本高, 不利于在我国普及。食源性接触丙烯酰胺对人类健康的影响与分析方法和分析数据的可靠性有直接的关系, 食品中痕量丙烯酰胺的检验重点是做好样品前处理和检测方法的选择。鼓励新型的检测方法, 诸如靶细胞分析定量, DNA 损伤测定等生物传感技术应用于丙烯酰胺的定量和定性分析检测中。

参考文献:

- [1] Anna C Vikstrom. In vivo doses of acrylamide and glycidamide in humans after intake of Acrylamide-Rich food[J]. **Toxicological Sciences**, 2011, 119(1): 41-49.
- [2] FDA. Detection and quantitation of acrylamide in foods[M]. [S.I.]: **US Food and Drug Administration**, 2002.
- [3] Young M S, Jenkins K M. Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. **Journal of AOAC International**, 2004, 87: 961-964.
- [4] 张齐, 蔡明招, 朱志鑫. 食品中丙烯酰胺分析的样品前处理技术[J]. 食品科技, 2006(7): 222.
ZHANG Qi, CAI Ming-zhao, ZHU Zhi-xin. Overview on sample preparation technique for the determination of acrylamide in foods[J]. **Food Science and Technology**, 2006(7): 222. (in Chinese)
- [5] 王海波. 离子色谱柱-质谱联用测定食品中丙烯酰胺[Z]. [S.I.]: 戴安中国有限公司应用研究中心, 2011.
- [6] Cavalli S, Maurer R, Hoeffler F, et al. Fast determination of acrylamide in food samples using accelerated solvent extraction followed by ion chromatography with UV or MS detection[J]. **LC-GC International**, 2003, 16: 9-11.
- [7] Anthony F L, Feiter M A. Silylation of acrylamide for analysis by Solid-Phase Microextraction/Gas chromatography Ion-Trap Mass spectrometry[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 2004(12): 3744-3748.
- [8] 权英, 孙静, 沈阳, 等. 丙烯酰胺分子印迹聚合物的制备及其性能研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 11(36): 276.
QUAN Ying, SUN Jing, SHEN Yang, et al. Study on preparation and performances of acrylamide molecularly imprinted polymers [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010, 11(36): 276. (in Chinese)
- [9] JIANG Dong-lei, SUN Xiu-lan, ZHANG Yin-zhi. Preparation and application of acrylamide molecularly imprinted composite solid-phase extraction materials[J]. **Analytical Methods**, 2012(4): 3760.
- [10] JI Jian, SUN Xiu-lan, TIAN Xiu-mei, et al. Synthesis of acrylamide molecularly imprinted polymers immobilized on graphite oxide through Surface-Initiated atom transfer radical polymerization[J]. **Analytical Letters**, 2012, 46: 969-981.
- [11] Zhang Y, Dong Y, Ren Y, et al. Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector[J]. **Journal of Chromatography A**, 2006, 1116: 209-216.
- [12] 程劫, 苏晓鸥, 张维, 等. 气相色谱-串联四极杆质谱测定餐厨废弃物中的丙烯酰胺[J]. 中国农业科学, 2012, 45(16): 3373-3381.
CHENG Jie, SU Xiao-ou, ZHANG Wei, et al. Determination of acrylamide in kitchen waste using gas Chromatography-Tandem mass spectrometry[J]. **Scientia Agricultura Sinica**, 2012, 45(16): 3373-3381. (in Chinese)
- [13] 郭志峰, 张丽霞, 王家强, 等. GC/MS 测定锅巴中丙烯酰胺含量[J]. 分析实验室, 2009, 12(28): 91-93.
GUO Zhi-feng, ZHANG Li-xia, WANG Jia-qiang, et al. Determination of acrylamide in crispy rice by GC/MS[J]. **Chinese Journal of Analysis Laboratory**, 2009, 12(28): 91-93. (in Chinese)
- [14] 于萍. 食品中丙烯酰胺检测方法的研究进展[J]. 福建分析测试, 2011(6): 21-23.
YU Ping. Research progress of detection of acrylamide in food[J]. **Fujian Analysis & Testing**, 2011(6): 21-23. (in Chinese)
- [15] 程江华, 王薇, 廖华俊, 等. LC-MS/MS 法测定 11 种鲜切油炸马铃薯片中丙烯酰胺的含量[J]. 中国食品学报, 2011, 7(11): 176-179.
CHENG Jiang-hua, WANG Wei, LIAO Hua-jun, et al. LC-MS/MS method for the determination of acrylamide in 11 varieties of fresh-cut fried potato chips [J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2011, 7 (11): 176-179. (in Chinese)
- [16] Renzo Bortolomeazzi, Marina Munari, Monica Anese, et al. Rapid mixed mode solid phase extraction method for the determination of acrylamide in roasted coffee by HPLC-MS/MS[J]. **Food Chemistry**, 2012, 135: 2687-2693.
- [17] 张辉珍, 马爱国, 孙永叶, 等. 食品中丙烯酰胺测定的前处理条件和色谱条件优化[J]. 食品科学, 2008, 4(29): 278-282.
ZHANG Hui-zhen, MA Ai-guo, SUN Yong-ye, et al. Optimization of pretreatment and chromatographic methods in acrylamide determi[J]. **Food Science**, 2008, 4(29): 278-282. (in Chinese)
- [18] 程喜明, 高峰, 付光亮, 等. 离子色谱法测定油炸食品中丙烯酰胺[J]. 现代仪器, 2010(4): 35-37.
CHENG Xi-ming, GAO Feng, FU Guangliang, et al. Determination of acrylamide in carbohydrate-rich fried food by ion-chromatography[J]. **Modern Instruments**, 2008, 4(29): 278-282. (in Chinese)