

# 食品中丙烯酰胺检测方法研究进展

费永乐,王丽然,李书国

(河北科技大学 食品科学与工程系,河北省 石家庄 050018)

**摘要:**丙烯酰胺是一种可能的致癌物,广泛存在于各种食品中,如焙烤类食物、油炸薯条和烤肉等。丙烯酰胺定量检测方法对于准确评估其对人体危害十分必要。综述了食品中丙烯酰胺的检测技术与方法如液质联用技术、液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳法、酶联免疫分析法(ELISA)和生物传感器法等,而酶联免疫分析法(ELISA)和生物传感器法具有快速方便、样品预处理程序简单、可实现批量样品快速检测等优点,将逐渐代替气相色谱和液相色谱法等传统方法,成为食品中丙烯酰胺检测的快速、便捷检测技术方法。

**关键词:**丙烯酰胺;食品安全;检测方法

**中图分类号:**TS 207.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)01-0070-04

## Progress in determination of acrylamide in food

FEI Yong-le, WANG Li-ran, LI Shu-guo

(Department of Food Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang Hebei 050018)

**Abstract:** Acrylamide, as probably carcinogen to human beings, exists widely in foods, such as baked foods, deep fried potatoes and barbecue. It is necessary to accurately assess the harm of acrylamide by quantitative determining acrylamide in food. The methods to detect acrylamide in foods, such as LC-MS, liquid chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis, enzyme-linked immunoassay (ELISA) and by biosensor, were summarized. Detecting by ELISA and biosensor possessed the virtue of rapidness and convenience, simplicity of sample pretreatment and determining samples in batch, which should replace conventional methods, such as gas chromatography or liquid chromatography, become the main quantification methods.

**Key words:** acrylamide; food safety; detection method

动物实验学证明:丙烯酰胺具有神经、遗传和生殖毒性,过量的丙烯酰胺为中等毒性物质,会引起动物基因突变,损伤生物体内的DNA,并具有致癌性<sup>[1]</sup>。同时丙烯酰胺具有较强的组织渗透性,可通过皮肤、口腔或呼吸道等多种途径进入生物体内,并快速分布于全身的组织中,而经口摄入被认为是人体吸收丙烯酰胺最迅速和最完整的途径<sup>[2]</sup>。自2002年瑞典国家食品局和斯德哥尔摩大学的科学家首次公布,油炸薯条、土豆片、面包等含淀粉碳水化合物化的食物,经120℃以上高温长时间油炸的食品中检测出丙烯酰胺以后,引起了世界各国政府和相关国际组织的广泛关注。世界卫生组织(WHO)

和联合国粮农组(FAO)联合召开多次会议,就食品中的丙烯酰胺问题展开讨论,并对食品中的丙烯酰胺进行了系统的危险性评估。FDA也开始研发能提供可靠数据的食品中丙烯酰胺含量的分析方法<sup>[3]</sup>。

丙烯酰胺分子量较低,极性较高,且缺乏明显的发色团(共轭双键、三键、苯环)等性质,使得定量分析丙烯酰胺很困难,以下对食品中丙烯酰胺定量检测方法的原理、方法研究进展进行综述。

### 1 食品中丙烯酰胺的检测技术与方法

丙烯酰胺为极性化合物,在水中的溶解度大,大多数食品样品中丙烯酰胺在水中能被完全提取,因此,水是目前应用最为广泛的提取溶剂。水与样品的比例可根据具体样品进行调整,主要有冷提取和热提取2种方法。冷提取一般是在室温下,将水与样品混合进行振荡提取或在高速匀浆机中混合提

收稿日期:2014-04-25

基金项目:国家自然科学基金面上项目(20876165);河北省教育厅科技项目(编号:2009329)

作者简介:费永乐,1989年出生,硕士研究生。

通讯作者:李书国,1969年出生,工学博士,教授。

取;热提取一般在60~70℃的热水中将样品进行振荡提取,提取效率高于冷提取法,适用于基质较为复杂的样品。由于丙烯酰胺在酸性溶液中也较为稳定,故美国FDA用0.1%的蚁酸水溶液提取样品<sup>[4]</sup>。张文玲<sup>[5]</sup>等用0.1%的甲酸溶液作为丙烯酰胺提取液,通过C<sub>18</sub>固相萃取小柱对食品样品丙烯酰胺提取液进行纯化,收集滤液用于液相色谱法分析。结果表明,该提取液既能有效排除油炸食品中一些非水溶性物质对丙烯酰胺提取、测定时干扰,又可以保证丙烯酰胺稳定性。

### 1.1 气相色谱—质谱(GC-MS)法

GB/T 5009.204—2005 食品中丙烯酰胺含量的测定方法将气相色谱—质谱(GC-MS)作为检测丙烯酰胺的标准方法<sup>[6]</sup>,该法要求被分析物必须具有一定的热稳定性和挥发性,但丙烯酰胺属热不稳定化合物,且一般的气相色谱检测器如电子俘获检测器(electron capture detector, ECD)对丙烯酰胺不响应,因此需要在上机之前对丙烯酰胺进行衍生化处理。各国研究者对于气相色谱检测丙烯酰胺也有大量研究。陈旭明<sup>[7]</sup>等建立一种用气相色谱—质谱联用法检测油炸型膨化食品中丙烯酰胺含量的方法,通过水提取油炸型膨化食品中的丙烯酰胺、Carrez试剂除蛋白、正己烷抽提油脂,溴化衍生后生成2,3-二溴丙烯酰(2,3-DBPA),气相色谱—质谱(GC-MS)特征离子定性,外标法定量,方法线性良好,线性范围为0.1~2 μg/mL,相关系数达0.9986,检出限为0.02 μg/mL。美国环境保护局(US. EPA)发布了关于GC测定水和其他物质中丙烯酰胺的方法。该法采用溴化试剂将丙烯酰胺衍生为2,3-二溴丙烯酰,用硅酸镁柱纯化样品,经5% FFAP(2 m × 3 mm)色谱柱分离,电子俘获检测器(ECD)测定。方法线性范围0~5 μg/L,检测限0.032 μg/L,回收率85.2% ± 3.3%<sup>[8]</sup>。

### 1.2 液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)

采用液相色谱法LC方法无需对丙烯酰胺进行衍生,可直接测定,简化了分析过程。熊杰<sup>[9]</sup>等人建立了直接进样—高效液相色谱—串联四极杆质谱同时分析水中丙烯酰胺、苯胺和联苯胺的分析方法。采用SHIMADZU Shim-pack FC-ODS柱(75 mm × 4.6 mm, 3 μm)为分离柱,甲醇和0.1%甲酸为流动相,采用梯度洗脱,流速0.2 mL/min,柱温40℃。经液相色谱分离后,采用串联四极杆质谱的多反应监测模式检测。Renzo Bortolomeazzi<sup>[10]</sup>通过SPE柱对咖啡样品进行前处理,用液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)测定丙烯酰胺含量。通过氘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 μg/kg,定量限

(LOQ)为16 μg/kg,检测灵敏度高、精度高。

### 1.3 酶联免疫分析法(ELISA法)

ELISA是在免疫反应的基础上,对丙烯酰胺进行定性定量分析。ELISA的基本原理是将特异的抗原-抗体免疫学反应和酶学催化反应相结合,以酶促反应的放大作用来显示初级免疫反应<sup>[11]</sup>。该方法准确、灵敏,检验成本低,具有广泛的实际应用价值。

丙烯酰胺属于小分子物质,本身不具备抗原决定簇,因此无法单独刺激合成抗体,但是它和一些大分子载体蛋白偶联后能刺激机体产生抗体。由于丙烯酰胺分子不能直接连接反应基团,因此首先要经过3-巯基苯甲酸衍生得到产物(Ade-3-MBA),形成的衍生物与载体蛋白连接<sup>[12]</sup>。常用到的载体蛋白有甲状腺球蛋白(BTG)和血清白蛋白(HSA),因其可溶性良好,分子量大小合适,有较多的官能团,因此可以用来耦合丙烯酰胺分子。该耦合过程符合Michael反应原理,即不饱和化合物与亲核基团(通常是胺基或者巯基)的相互作用。制备好的衍生物-载体蛋白结合物定期免疫实验动物(兔子或小白鼠)制备出多克隆抗体。

ELISA基本方法有三类,即间接法、双抗体法和抗原竞争法。其中检测丙烯酰胺常用的是抗原竞争法。将已知抗体包被在聚苯乙烯微量反应板的凹孔中,洗去未结合的抗体。将待测的半抗原样品(Ade-3-MBA-HSA)与相应的酶标半抗原以适当比例混合后加到凹孔中,将缓冲液与同样比例的酶标半抗原加到另一凹孔中作为对照。酶和抗体偶联的好坏直接影响试剂的灵敏度<sup>[13]</sup>。应用于ELISA的酶主要有辣根过氧化氢酶(HRP)和碱性磷酸酯酶(AKP),其中以HRP用得最多。待测样品中如有相应半抗原存在,必与标记半抗原竞争抗体,其竞争力的大小与样品中半抗原的量成正比。再次洗涤,除去标记的和未标记的游离半抗原,加底物使之显色,经一定时间终止反应<sup>[14]</sup>。颜色深浅与待测半抗原的含量成反比,可用酶标仪进行定量测定,一般用酶标仪在450 nm处测定吸光度,可得丙烯酰胺含量。

Zhou<sup>[15]</sup>等用其他ELISA法(BI-ELISA法)探讨了生物素-亲和素酶联免疫法测定食品中的丙烯酰胺。研究人员用与丙烯酰胺结构类似的N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(NAS)作为抗原,与牛血清蛋白(BSA)偶联,刺激机体产生抗体。亲和素与生物素有极强的亲合性,其亲合力为一般抗原抗体反应的100万倍<sup>[16]</sup>,高的灵敏度对酶联免疫法准确性至关重要,该法正是利用这种极强的亲合性提高了检测的灵敏度。Quan<sup>[17]</sup>等人在Zhou实验基础上,综合运用ELISA和增强化学发光法(ECL)检测了薯片、

速食面条、软曲奇和蛋糕中的丙烯酰胺。实验中用 NAS 在兔子体内刺激产生的抗体与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 结合进行丙烯酰胺定量分析,建立了化学发光酶联免疫分析法,相较之传统的比色法,大大的提高了反应的灵敏度,同时由于免疫反应的高度特异性,很大程度上减少了复杂食品体系中其他物质的干扰。测定几种食物样品中丙烯酰胺的水平分别为薯条 126 ng/mL、速食面 41 ng/mL、软曲奇 137 ng/mL 和蛋糕 69 ng/mL。

#### 1.4 生物传感器法

生物传感器作为一种新型的生物分析手段,可用于测定食品中的丙烯酰胺。生物传感器是将生物识别元件和信号转换元件紧密结合,检测目标化合物的分析装置。其基本原理为:待测物质和分子识别元件特异性结合,发生生物化学反应,产生的生物学信息通过信号转换器转化为可以定量处理的电、光等信号,再经仪表放大和输出,从而达到分析检测的目的。图 1 是生物传感器工作原理<sup>[18]</sup>。

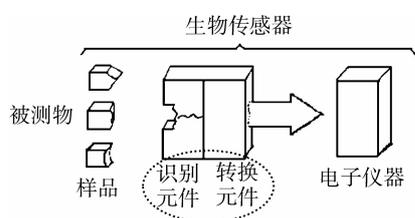


图 1 生物传感器工作原理

Ignatov<sup>[19]</sup>等人首次将生物传感器技术运用到丙烯酰胺的定量检测中,把 Clark 氧电极作为安培电流传感器的核心部分,由于废水中痕量的丙烯酰胺和丙烯酸对短杆菌的呼吸速率有影响,因此随着耗氧量的增减,电流传感器中的分析反应同时改变,确切来说,丙烯酰胺的增加会降低体系中氧浓度,同时降低了 Clark 氧电极电流强度,该方法检测限可达 10 mg/L,样品制备简单,时间较短,为传感器技术测定丙烯酰胺含量提供了依据。

近十年来,国内外研究在应用生物传感器技术测定各种食品体系中痕量的丙烯酰胺有了进一步发展。张文玲<sup>[20]</sup>等研究了丙烯酰胺在铂电极上的电化学反应过程,利用电化学生物传感器测定油炸食品中的丙烯酰胺的含量。Silva<sup>[21]</sup>等人运用电位生物传感器和离子选择电极,先使绿脓杆菌细胞与戊二醛交联,再固定在聚合物表面,制备成铵离子选择电极,由于该细菌体内的酰胺酶可以催化丙烯酰胺向丙烯酸和铵离子转变,因此酰胺酶的酶活作为检测丙烯酰胺含量的指标。另外国外也有用某些特殊生物传感器用于测定食品中丙烯酰胺含量的报道,如细胞生物传感器。这种传感器可以测量细胞由于丙烯酰胺的刺激而发生的物理学或者生理学的改

变,因此可以定量检测丙烯酰胺。Hasegawa 等人利用细胞生物传感器对丙烯酰胺定量分析且提出了一些抑制食品中丙烯酰胺形成的方法。实验人员对线虫基因进行改造,使谷胱甘肽转移酶 (GST) 和绿色荧光蛋白 (GFP) 进行基因融合 (GST, GFP 分别来自于启动子 GST-4 和报道基因),由于丙烯酰胺能刺激报道基因的翻译,从而启动 GFP 的合成,测得 GFP 含量即可。GFP 含量方便易得,因此该法可行且准确度高。除此以外,有研究者将丙烯酰胺和四内酰胺交联物作为传感器的活性成分测定丙烯酰胺<sup>[22]</sup>。Kleefisch<sup>[23]</sup>等人将四内酰胺包被在石英表面,当丙烯酰胺蒸汽蒸发到石英表面,就会与表面包被的四内酰胺结合,从而增加重力感应元件的质量,质量增加值可以用石英晶体微天平技术 (QCM) 测量。实验表明,四内酰胺性质稳定,对丙烯酰胺表现出相当强的结合力,四内酰胺包被的压电式传感器对丙烯酰胺有较高灵敏度和较低检测限 (10 μg/kg),可以检测到痕量的丙烯酰胺,也不受相对湿度影响,但是仅适用于有限种类食品中丙烯酰胺的检测。

除了以上方法,现在一部分研究集中于用血红蛋白 (Hb) 修饰的电极测定食品中的丙烯酰胺。大量实验表明,丙烯酰胺可以和血红蛋白结构中缬氨酸的 α-NH<sub>2</sub> 发生 Michael 亲核加成反应,最终生成聚合物,因此可作为感应器检测丙烯酰胺的含量。Stobiecka 等人<sup>[24]</sup>在此基础上改进了方法,在醋酸盐缓冲液中分散的血红蛋白和表面活性剂 (DDAB) 形成脂质体 DDAB-Hb,将 DDAB-Hb 混合物涂布在碳糊电极 (CPE) 表面形成膜,检测时,溶液中的丙烯酰胺与血红蛋白反应,其产物会改变电极表面血红蛋白的结构和电化学活性,伴随着电极表面 AA-Hb 聚合物的增多,血红素中铁离子在电极表面的氧化还原反应也会受到抑制,此时用循环伏安法可以准确测得发生电极表面铁离子的氧化还原反应,从而可对检测液中丙烯酰胺定性定量分析。实验中检测薯条中丙烯酰胺含量,检测限为  $1.2 \times 10^{-10}$  mol/L。

一些生物分子如 Hb 吸附在裸电极上通常会导导致失活或者钝化,所以生物传感器关键问题在于生物成分的固定化。使用传感器测丙烯酰胺含量,如何确定生物分子的最优固定化条件是制备生物传感器的关键。Krajewska<sup>[25]</sup>等人采用循环伏安传感器,将 Hb 固定在用单壁碳纳米管 (SWCNT) 修饰的玻碳电极上 (GCE) 测定马铃薯片中丙烯酰胺含量。实验证明,电极的灵敏度不会受到食品体系中其他成分的影响。在此基础上,有人提出用奥斯特方波法取代循环伏安法测定丙烯酰胺含量,结果表明,前

者具有更高的灵敏度,检测限可达  $1 \times 10^{-10}$  mol/L。

生物传感技术具有高灵敏度和选择性,基本不受食品体系中其他成分的干扰等特点,很适合测定食品丙烯酰胺含量。因此近几年来,用生物传感技术定量分析食品中丙烯酰胺的方法得到越来越多的重视。

### 1.5 毛细管电泳法

毛细管电泳法对被分析成分的提取、纯化及衍生等预处理没有严格的要求,虽灵敏度没有 HPLC 和 GC 高,但还是有不少研究者将毛细管电泳与质谱、核磁共振及串联质谱等结合应用到丙烯酰胺的检测中。Tezcan<sup>[26]</sup> 将非水毛细管电泳引入二极管阵列检测中,进一步提高了 210 nm 处在线紫外检测丙烯酰胺的灵敏度。周等用胶束电动毛细管色谱检测土豆中的丙烯酰胺,所测值与 FDA 所规定薯片中含丙烯酰胺的限量范围一致(0.693 ~ 2.510 mg/kg)。

## 2 结语

目前国际上已研究开发了多种丙烯酰胺的检测方法,其中色谱法最为成熟,灵敏度高且准确可靠,但是色谱法往往需要较昂贵的仪器设备及专业操作人员,且样品前处理通常比较复杂,检测费用高,因此难以进行大范围的样品监测。

随着世界各国对食品中丙烯酰胺的暴露水平的重视,研究具有简便、灵敏、准确、成本低的快速检测方法十分必要。免疫检测技术被认为是 21 世纪最具竞争性和挑战性的微量及痕量快速检测技术之一,具有良好的应用前景。但是,由于丙烯酰胺分子量小,难以获得特异性高、灵敏度好的抗体,因此目前尚未能进行实际应用。解决的途径之一可以通过对丙烯酰胺进行衍生化处理,使其分子量增大而提高特异性抗体制备机率<sup>[19]</sup>。生物传感技术基本不受食品体系中其他成分的干扰,具有高灵敏度和选择性,很适合测定食品丙烯酰胺含量。用生物传感技术定量分析食品中丙烯酰胺的研究表现出巨大的发展潜力。

### 参考文献:

[1] 范云露,陆启玉. 食品中丙烯酰胺的形成与风险分析[J]. 粮油食品科技, 2013, 5(21):84-88.  
 [2] 朱雨辰. 食品中丙烯酰胺的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2):313-318.  
 [3] 葛宇,赵旭丽,巢强国. 食品中的丙烯酰胺分布及其检测方法研究进展[J]. 粮食加工, 2008, (6):106-110.  
 [4] 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, 20(6):21-23.  
 [5] 张文玲,郭颖,李书国. 中式油炸食品中丙烯酰胺测定及降低方法初探[J]. 粮食与油脂, 2011(12):23-26.  
 [6] GB/T 5009.204—2005,食品中丙烯酰胺含量的测定方法[S].  
 [7] 陈旭明,杨泽川. 气质联用法测定油炸型膨化食品中的丙烯酰

胺[J]. 光谱实验室, 2013, 9(30):2561-2562.

[8] US EPA. Method 8032A, Acrylamide by Gas Chromatography[S].  
 [9] 熊杰. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水中丙烯酰胺、苯胺和联苯胺[J]. 分析化学研究报告, 2014, (1):93-98.  
 [10] Renzo Bonolomeazzi, 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.  
 [11] 武中平. 酶联免疫分析法及其在食品农药残留检测中的应用[J]. 江苏农业科学, 2007, (1):198-201.  
 [12] Preston A, Fodey T, Elliott C. Development of a high-throughput enzymic-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 608(2):178-185.  
 [13] 付云洁,李琦,陈江源. ELISA 法测定热加工食品中的丙烯酰胺[J]. 中国酿造, 2011, (5):77-81.  
 [14] 郭玉莲. 农药残留的酶联免疫分析技术及研究进展[J]. 农机化研究, 2006, (2):201-202.  
 [15] Zhou S, Zhang C, Wang D, Zhao M P. Antigen synthetic strategy and immunoassay development for detection of acrylamide in foods[J]. Analyst, 2008, 133:903-909.  
 [16] 蒋垂昌. 酶联免疫吸附试验在毒物分析中的应用[J]. 中国法医学杂志, 1992, (7):246-248.  
 [17] Quan Y, Chen M L. Development of an enhanced chemiluminescence ELISA for the rapid detection of acrylamide in food products[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011 59(13):6895-6899.  
 [18] 蒋雪松,王剑平. 用于食品安全检测的生物传感器的研究进展[J]. 农业工程学报. 2007, 5(23):272-275.  
 [19] O. V. Ignatov, N. A. Khorkina, S. Yu. Shchyogolev, N. G. Khlebtsov, S. M. Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, (11):241-247.  
 [20] 张文玲. 微分脉冲伏安法快速测定油炸食品中丙烯酰胺[J]. 食品科学, 2013, 34(22):154-159.  
 [21] Joanna O, Ewa N. New trends in quantification of acrylamide in food products[J]. Talanta, 2011, (86):143-151.  
 [22] Palchett I, Mascini M. Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008, 391(2):455-471.  
 [23] 布莱恩 R, 埃金斯. 著, 罗瑞贤, 陈亮寰, 陈霭盘. 译 化学传感器与生物传感器[M], 北京:化学工业出版社, 2005, 103-104, 70-72.  
 [24] Stobiecka A, Radecka H, Radecki J. Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2007, 22(9-10):2165-2170.  
 [25] Agnieszka Krajewska, Jerzy Radecki, Hanna Radecka. A Voltammetric Biosensor Based on Glassy Carbon Electrodes Modified with Single-Walled Carbon Nanotubes/Hemoglobin for Detection of Acrylamide in Water Extracts from Potato Crisps[J]. Sensors, 2008, (8), 5832-5844.  
 [26] Tezcan F, Erim F B. On-line stacking techniques for the non-aqueous capillary electrophoretic determination of acrylamide in processed food[J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 617(1-2):196-199. 