

食品包装材料中丙烯酰胺在大鼠肝微粒和 S9 中的体外代谢研究

付善良, 丁利, 朱绍华, 龚强, 焦艳娜, 王利兵*

(湖南出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 国家食品安全检测重点实验室, 食品安全科学技术湖南省重点实验室, 长沙 410004)

摘要: **目的** 研究食品包装材料中丙烯酰胺(acrylamide)的体外代谢情况, 并确证其代谢产物。**方法** 采用肝微粒体及肝 S9 体外温孵法, 优化代谢条件, 对丙烯酰胺进行了体外代谢研究, 并用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测并确证丙烯酰胺的代谢物。**结果** 通过检测结果发现, 丙烯酰胺分别在肝 S9 和肝微粒体作用下发生显著的代谢反应, 其代谢产物之一为环氧丙酰胺。**结论** 丙烯酰胺能通过代谢转化成毒性更强的环氧丙酰胺, 因此, 监控食品、饮水和周围环境中的丙烯酰胺的含量对于维护人们的健康具有重要的意义。

关键词: 食品包装; 丙烯酰胺; 代谢; 肝微粒; S9

Metabolism of acrylamide by rat liver microsomes and S9 *in vitro*

FU Shan-Liang, DING Li, ZHU Shao-Hua, GONG Qiang, JIAO Yan-Na, WANG Li-Bing

(Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, State Key Laboratory of Food Safety Testing, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Changsha 410004, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the metabolism and the metabolin of acrylamide in rat liver microsomes and S9 *in vitro*. **Methods** The metabolism was researched in rat liver microsomal and S9 incubation systems *in vitro*. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed to determine acrylamide and its metabolin. **Results** Acrylamide was evidently metabolized by rat liver microsomes and S9, and one of the metabolins was found to be glycidamide. **Conclusion** Acrylamide can be metabolized to more toxic compound, glycidamide. Therefore, it is of great significance to monitor acrylamide in food, drinking water and the surrounding environment, for the maintenance of people's health.

KEY WORDS: food packaging; acrylamide; metabolism; liver microsomes; S9

1 引言

丙烯酰胺(acrylamide)是一种水溶性极强的不饱

和羰基化合物, 是一种用途广泛的重要有机化工原料, 以它为单体合成的产品不下百种, 其中以聚丙烯酰胺用途最为广泛。同时丙烯酰胺也在食物中广泛存

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD29B05)

Fund: Supported by the National Key Technology Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (2012BAD29B05)

*通讯作者: 王利兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全及化学品安全。E-mail: wanglb0419@126.com

*Corresponding author: WANG Li-Bing, Researcher, Hunan Key Laboratory of Food Safety Science & Technology, Technology Center of Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China. E-mail: wanglb0419@126.com

在, 2002年瑞典斯德哥尔摩大学的 Margareta Tornqvist 教授在油炸及焙烤的马铃薯和谷物类食品中发现了丙烯酰胺, 而且在薯条中检出的浓度超过 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1], 引起了包括世界卫生组织等国际机构的重视^[2]。丙烯酰胺也是一种神经毒素, 很容易经消化道、皮肤、肌肉或其他途径吸收, 可导致细胞遗传物质 DNA 的损伤, 对人类有潜在的致癌性^[3]。国际癌症机构也把它定为“人类可能的致癌物”^[4]。因此研究丙烯酰胺的代谢行为, 对评估丙烯酰胺的生物毒性, 维护公众的安全十分必要。

药物代谢是指药物进入体内后, 在机体作用下发生化学结构转化, 也就是生物转化 (drug biotransformation)。因此, 研究药物的生物转化, 明确代谢行为, 对研究药物的生物毒性具有重要意义。体内代谢是研究药物代谢的理想方式, 但是由于生物体的体内代谢研究周期长, 需要消耗大量的样品和实验动物, 同时代谢重复性也很难保证。因此, 体外代谢是研究药物代谢的最常用的方法。肝脏是药物代谢的主要器官, 是药物转化的主要场所, 含有参与药物代谢的重要酶系(细胞色素 P450 酶, CYP450), 这些酶系参与药物及各种内源性和外源性化合物在体内的代谢过程, 大多数药物代谢的 I 相和 II 相代谢都在肝药酶系统的参与下发生的, 因此药物的体外代谢模型主要是以肝脏为基础的。与体内代谢研究相比, 体外代谢研究具有快速简便的特点, 不需消耗大量的样品和实验动物, 研究费用相对较低, 适合于大批量化合物的药代筛选, 同时可以排除体内诸多的干扰因素, 直接观察到代谢酶对底物的选择性代谢, 为体内代谢研究提供重要的线索和依据, 对于体内代谢转化率低, 且缺少高灵敏检测手段的药物来说, 体外代谢更是一种优秀的研究手段^[5]。以肝脏为基础的体外代谢系统主要包括肝微粒体体外温孵法、基因重组 CYP450 酶系法、肝细胞体外温孵法、肝组织切片法及离体肝灌流等方法, 其中以肝微粒体体外温孵法应用最广泛^[6,7]。相对于其他几种体外代谢方法, 肝微粒体体外温孵法具有酶制备技术简单、代谢过程快、结果重现性好、易于大批量操作等优点。

丙烯酰胺的检测方法通常为高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[8]和液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS)^[9,10]。本研究采用肝微粒体及肝 S9 体外温孵法, 对丙烯酰胺进行体外代谢研究, 并用 LC-MS/MS 检测和确证丙烯酰胺的代

谢物。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

API 4000 三重四级杆质谱仪(美国应用生物系统公司), 配有岛津高效液相色谱仪; 高速离心机(德国 Sigma 公司); 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 涡旋混匀器(Vortex Genie3, 美国 SI 公司); 超声波振荡器(KQ-250E, 美国舒美公司); 水浴锅(德国 Memmert 公司); $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

甲醇、乙腈均为色谱纯(德国 Merck 公司); PBS 缓冲液; 水为超纯水(美国 Millipore 超纯水仪制备)。丙烯酰胺(纯度 $>99.9\%$, 美国 Sigma 公司), 环丙氧酰胺(纯度 $>99.9\%$, 美国 Sigma 公司)。肝 S9、肝微粒体、NADHP 再生系统(溶液 A、溶液 B)(北京汇智泰康公司)。

2.2 方法

2.2.1 标准溶液配制

分别准确称取 100.0 mg 丙烯酰胺和环丙氧酰胺标准品, 用甲醇溶解定容至 10 mL , 配成 $10.0 \text{ mg}/\text{mL}$ 的标准储备溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存; 取上述标准储备液, 用甲醇稀释成 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的中间标准溶液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏储存; 取适量储备液, 用甲醇稀释定容, 配成浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。

2.2.2 体外代谢实验

肝微粒体体外温孵实验, 是采用从肝脏中提取的肝微粒体或 S9, 和还原型辅酶 II (NADPH) 再生系统, 在模拟生理环境下进行代谢反应。

将 $50 \mu\text{L}$ 溶液 A, $10 \mu\text{L}$ 溶液 B, $440 \mu\text{L}$ $0.1 \text{ mol}/\text{L}$ 磷酸钾缓冲液混匀, 配成代谢所需要的孵育体系。加入 $1.0 \text{ mg}/\text{mL}$ 丙烯酰胺 $5 \mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中预热 5 min , 分别加入肝 S9、肝微粒体(浓度为 $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$)。轻轻混匀后, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 60 min 。加入等体积 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的甲醇终止反应, $14\ 000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min , 取上清液过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, 进行 LC-MS/MS 检测。丙烯酰胺实验分为 3 组: 空白对照组(不加代谢试剂)、肝 S9 组、肝微粒体组。

2.2.3 色谱条件和质谱条件

色谱柱: Agilent eclipse C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$); 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: $10 \mu\text{L}$; 流动相: 甲醇(A)和 0.1% 甲酸

溶液(B), 流速: 0.50 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~3 min, 90%B~5%B; 3~6 min, 5%B~90%B; 6~8 min 90%。

质谱离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 雾化气(Gas1): 413 kPa(60.00 psi); 辅助气(Gas2): 448 kPa(65.00 psi); 离子喷雾电压(IS): 5000.00 V; 气帘气(Cur): 137 kPa(20.00 psi); 离子化温度(TEM): 500 °C; 检测方式: 多反应监测扫描模式(MRM)。

3 结果与讨论

3.1 检测方法的优化

流动相选择甲醇-水, 其中水相中添加 0.1%甲酸提高离子化效率, 增加目标离子的信号响应值。

将标准储备液稀释制备成合适的浓度, 根据目标物的性质和分子结构, 选择正电离模式, 通过全扫描方式观察总离子流图。找到精确分子离子, 根据分子离子选择适合的子离子, 作为定量定性离子。再通过优化碰撞能量、去簇电压等参数, 使离子的响应达到最佳。优化后的丙烯酰胺和环氧丙酰胺的质谱条件见表 1。

表 1 多反应监测质谱参数

Table 1 Parameters of multiple reaction monitoring detection

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压 (v)	碰撞能量 (e/v)
丙烯酰胺	71.9	55.1	42	15
		71.9	42	5
环氧丙酰胺	88.0	45.2	46	15
		71.2	46	15

3.2 代谢反应条件的优化

体外代谢是模拟肝细胞代谢环境, 代谢反应体系中有有机试剂的含量控制在 1%以内, 以免影响代谢反应的进行, 因此在配制代谢孵育体系时, 标样的浓度要适当。代谢反应的主要影响因素是体外代谢试剂浓度以及代谢反应时间。因此, 从试剂浓度、反应时间两方面对代谢条件进行优化。首先, 固定代谢试剂浓度为 0.5 mg/mL, 水浴温度 37 °C, 考察了代谢时间对代谢量的影响。从图 1 A 可以看出, 丙烯酰胺的代谢量随代谢时间的增加而增加, 但当代谢时间超过 60 min 后, 代谢量基本无变化。因此, 代谢反应时间选择 60 min。然后, 固定反应时间为 60 min, 水浴温度 37 °C, 考察了代谢试剂的浓度对代谢量的影响。

结果发现(图 1B), 当浓度小于 0.5 mg/mL 时, 丙烯酰胺的代谢量随代谢试剂浓度的增加而迅速增加, 当代谢试剂浓度大于 0.5 mg/mL 时, 丙烯酰胺代谢量没有显著增加。因此, 将代谢反应中代谢试剂 S9 和微粒体的浓度设定为 0.5 mg/mL。

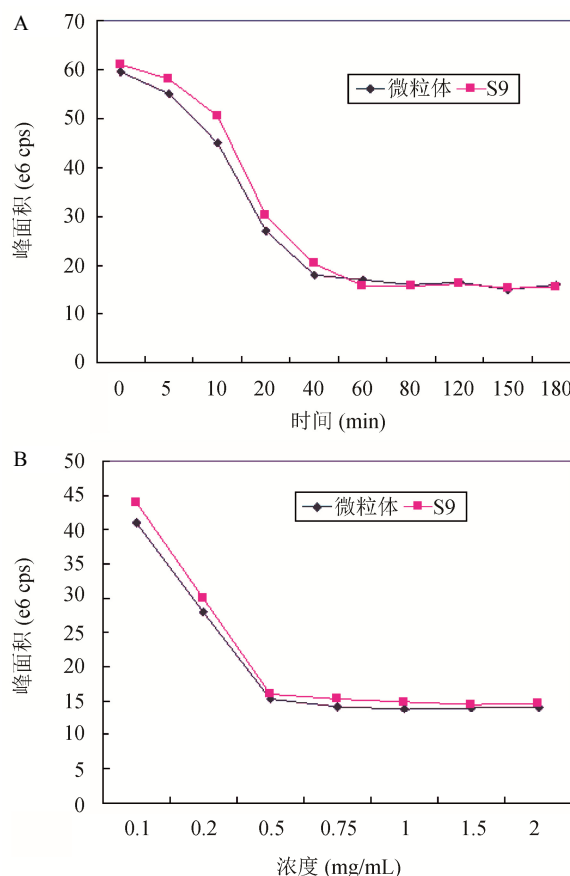


图 1 体外代谢反应条件的优化

Fig. 1 Optimization of *in vitro* metabolic reaction conditions
A: 反应时间与丙烯酰胺峰面积变化图; B: 代谢试剂浓度与丙烯酰胺峰面积变化图

A: Effect of the reaction time on the peak area of acrylamide, B: Effect of the concentration of reagents on the peak area of acrylamide

3.3 丙烯酰胺代谢情况

采用液相色谱-质谱分析方法检测经肝 S9、肝微粒体代谢后的丙烯酰胺。图 2 显示, 同浓度标样丙烯酰胺峰面积为 5.95×10^7 , 对照组丙烯酰胺峰面积为 6.00×10^7 , 肝 S9、肝微粒体组峰面积分别为: 1.59×10^7 、 1.51×10^7 。可见, 经两种代谢试剂代谢后, 丙烯酰胺的浓度显著降低(分别降低了约 73%和 75%), 说明在肝 S9 及肝微粒体的作用下, 丙烯酰胺产生了很大程度的代谢。

3.4 丙烯酰胺代谢产物

根据相关文献^[11,12], 丙烯酰胺在大鼠体内通过细胞色素 P4502E1(CYP2E1)代谢为环氧丙酰胺。本实验采用前文所述分析条件, 通过对环氧丙酰胺标准溶液、肝 S9

代谢组、肝微粒体代谢组和对照组的 HPLC-MS 分析, 发现在对照组中未检测到环氧丙酰胺, 而在肝 S9 组和肝微粒体组中均检测到环氧丙酰胺(见图 3)。可见, 经两种代谢试剂代谢后, 丙烯酰胺的确能代谢为环氧丙酰胺。

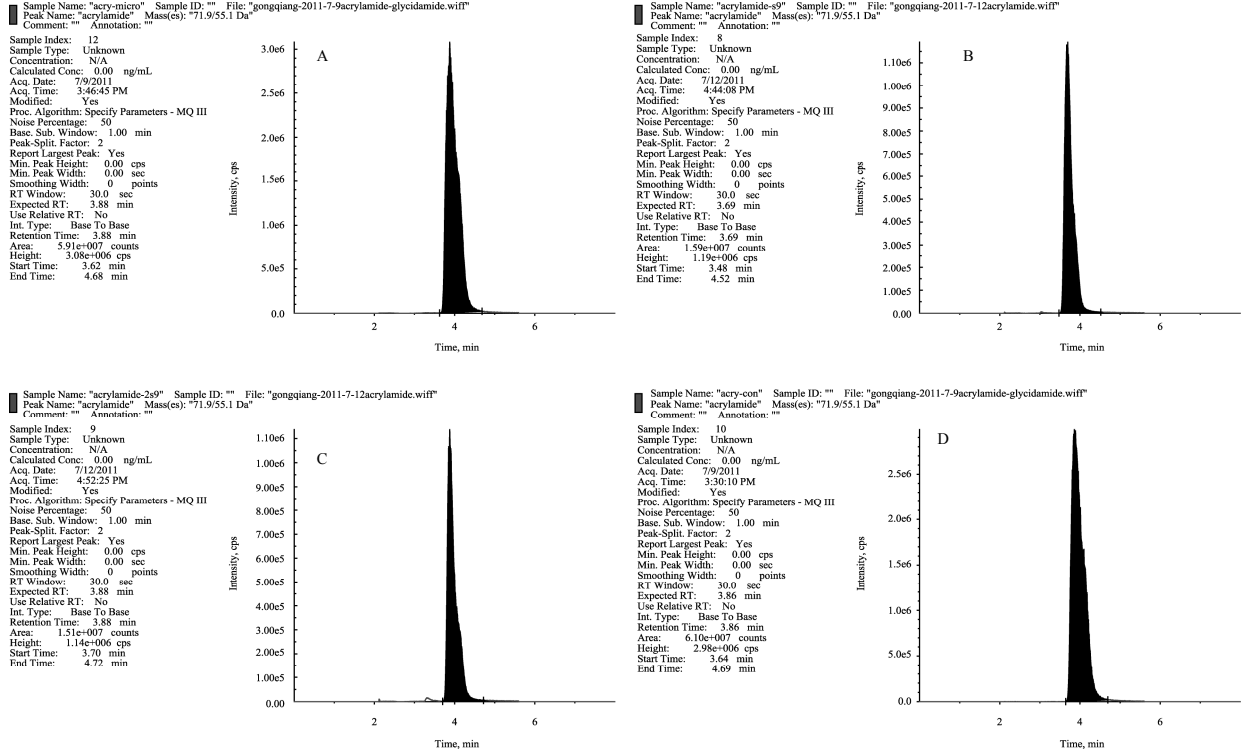


图 2 丙烯酰胺代谢后各样品(A: 标样; B: S9 组; C: 微粒体组; D: 对照组)中丙烯酰胺相应强度
Fig. 2 The corresponding strength of acrylamide in samples (A: standard solution, B: S9 group, C: microsomes group, D: control group) after metabolism

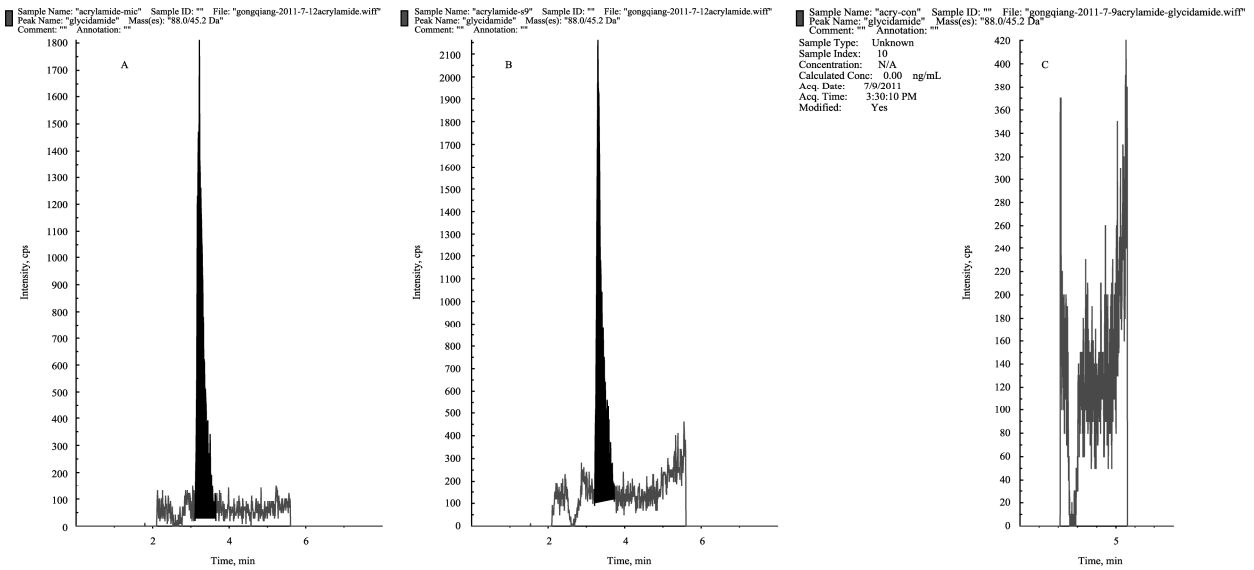


图 3 代谢反应后各样品(A: S9 组; B: 微粒体组; C: 对照组)中丙烯酰胺代谢物环氧丙酰胺峰面积
Fig. 3 Peak area of glycidamide, which produced by each solution (A: S9 group, B: microsomes group, C: control group) after metabolic reaction

环氧丙酰胺比丙烯酰胺更容易与 DNA 结合, 导致遗传物质损伤和基因突变, 是丙烯酰胺主要的致癌活性代谢产物。环氧丙酰胺还是一种神经毒素, 对神经系统中肌酸激酶活性有很大影响。

4 结 论

本文利用液相色谱-质谱法检测技术, 通过优化代谢条件, 研究了丙烯酰胺的体外代谢情况。实验结果表明, 丙烯酰胺能在肝 S9 和肝微粒体的作用下, 发生显著的代谢反应, 并代谢为毒性更强的环氧丙酰胺。因此, 监控食品、饮水和周围环境中的丙烯酰胺的含量对于维护人们的健康具有重要的意义。

参考文献

- [1] Swedish NFA. Information about acrylamide in food [EB/OL]. [2002-04-24]. <http://www.slv.se/engdefault.asp>.
- [2] WHO. Acrylamide: health and safety guide No. 45. Geneva: world health organization, 1991[EB/OL]. <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg045.htm>.
- [3] Bergmark E, Calleman CJ, He F, *et al.* Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, 120: 45–54.
- [4] UK Food Standards Agency. Background Information & Research Findings [EB/OL]. [2002-05-17]. <http://www.food.gov.uk>.
- [5] 王广基, 刘晓东, 柳晓泉. 药物代谢动力学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
Wang GJ, Liu XD, Liu XQ. *Pharmacokinetics* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2001.
- [6] Sung JC, Hye YJ, Soo KB, *et al.* LC-MS/MS identification of *in vitro* metabolites of a new H⁺/K⁺ ATPase inhibitor, KR-60436 produced by rat and human liver microsomes [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 28(11): 897–902.
- [7] Anne D, Delphine B, Odile T, *et al.* *In vitro* oxidative metabolism study of (-)-rhazinilam [J]. *Bid Med Chem*, 2006, 14(10): 1558–1564.
- [8] Barber DS, Hunt J, Lopachin RM. Determination of acrylamide and glycidamide in rat plasma by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *J. Chromatogr. B*, 2001, 758(2): 289–293.
- [9] Thomas W, Lubomir K. Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and on gas chromatography–mass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1132(1): 211–218.
- [10] Lee Maw-rong, Chang Li-yo, Dou JP. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry [J]. *ACA*, 2007, 582(1): 19–23.
- [11] Ghanayem BI, Witt KL, Kissing GE. Absence of acrylamide-induced genotoxicity in CYP2E1-null mice; evidence consistent with a glycidamide-mediated effect [J]. *Mutat Res*, 2005, 578(3): 284–297.
- [12] Ghanayem BI, Witt KL, Eihadri L. Comparison of germ-cell mutagenicity in male CYP2E1-null and wild-type mice treated with acrylamide: evidence supporting a glycidamide-mediated effect [J]. *Biol Reprod*, 2005, 72(1): 157–163.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



付善良, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: fsl432@163.com



王利兵, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全及化学品安全。
E-mail: Wanglb@126.com