

高效液相色谱法测定高温加工食品中丙烯酰胺

战旭梅, 刘萍*, 祁兴谱, 胥栋豪

(江苏农牧科技职业学院食品科技学院, 泰州 225300)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法测定高温加工食品中丙烯酰胺含量的分析方法。**方法** 样品粉碎后经超纯水提取、正己烷脱脂、C₁₈ 固相萃取柱萃取、流动相洗脱后得到样品净化液, 经高效液相色谱仪, 以乙腈-水(体积比 2:98)作为流动相, 流速为 0.8 mL/min, 测定波长 205 nm, 柱温 20 °C 的色谱条件测定, 外标法定量。**结果** 在该条件下, 丙烯酰胺在 0.1~2.0 μg/mL 内具有良好的线性关系($r^2=0.9987$), 检出限 14 μg/kg, 定量限 40 μg/kg, 加标回收率在 91.5%~95.0%之间, 1.0 μg/mL 丙烯酰胺标准溶液重复 6 次进样的相对标准偏差为 (relative standard deviation, RSD)为 0.16%。**结论** 此方法可以准确、快速测定高温加工食品中的丙烯酰胺含量。**关键词:** 高温加工食品; 丙烯酰胺; 高效液相色谱法

Determination of acrylamide in high temperature processed food by high performance liquid chromatography

ZHAN Xu-Mei, LIU Ping*, QI Xing-Pu, XU Dong-Hao

(School of Food Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography method for the determination of acrylamide in high temperature processed food. **Methods** The sample was extracted by ultra-pure water after crushed, degreased by n-hexane, extracted by C₁₈ solid phase extraction column and eluted by mobile phase. The sample was purified by high performance liquid chromatography with acetonitrile water (2:98, V:V) as mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min, the detection wavelength was 205 nm, and the column temperature was 20 °C. The external standard method was used for quantitative determination. **Results** Under these conditions, the linear range of acrylamide was 0.1–2.0 μg/mL ($r^2=0.9987$), the limit of detection was 14 μg/kg, the limit of quantitation was 40 μg/kg, the recovery rate was 91.5%–95.0%, and the relative standard deviation (RSD) of 1.0 μg/mL acrylamide standard solution after 6 injections was 0.16% ($n=6$). **Conclusion** This method can accurately and quickly determine the content of acrylamide in high temperature processed food.

KEY WORDS: high temperature processed food; acrylamide; high performance liquid chromatography

1 引言

丙烯酰胺(acrylamide, AA)是世界公认的具有神经毒性、生殖毒性、基因毒性以及潜在致癌性的食品内源性污染物, 已经被国际癌症研究机构定位为 2A 类致癌物^[1,2]。

2002 年瑞典科学家发现油炸马铃薯条, 烘焙的面包等产品中, 存在潜在致癌性的丙烯酰胺后^[3], 通过对大量食品的研究, 认为含淀粉类的食品在高温烘烤或者油炸条件下, 原料中的天门冬酰胺和还原性糖会通过美拉德反应产生丙烯酰胺^[4-6], 而且, 丙烯酰胺的含量会随着加热温度和加热

*通讯作者: 刘萍, 博士, 副教授, 主要研究方向为功能性食品。E-mail: 12404989@qq.com

*Corresponding author: LIU Ping, Ph.D, Associate Professor, School of Food Science and Technology, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China. E-mail: 12404989@qq.com

时间的增加而增加^[7], 因此, 对淀粉类食品中丙烯酰胺含量的检测和监控有着重要的意义。

目前, 食品中丙烯酰胺检测法方法有气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法、毛细管电泳法、酶联免疫法、生物传感器法^[8-11]等。GB 5009.204-2014《食品安全国家标准食品中丙烯酰胺的测定》^[12]采用稳定同位素稀释的液相色谱-质谱/质谱法和气相色谱-质谱法, 方法灵敏度高, 但由于这 2 种方法对仪器设备要求较高, 仪器价格昂贵, 不能广泛应用。

本研究以高温加工的食品为样品, 通过固相萃取净化条件的选择、色谱条件流动相、测定波长、流速的选择, 建立高效液相色谱法检测丙烯酰胺含量的方法, 有助于高温加工食品中丙烯酰胺的检测和监控, 保障人民的食品安全。

2 材料与方 法

2.1 材料与设备

丙烯酰胺标准品(纯度 $\geq 99.5\%$, 国家标准物质中心); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Dikma 公司); 正己烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水均为超纯水。

Agilent-1260 液相色谱仪、Eclipse XDB-C₁₈ 液相色谱柱(美国安捷伦公司); C₁₈ 固相萃取小柱(美国 Thermo 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司); 5810R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); AL204 电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); YB-1000A 高速多功能粉碎机(永康市速锋工贸有限公司); DF-101SE 磁力搅拌器(南京予华仪器有限责任公司)。

2.2 色谱条件

色谱柱: (Eclipse XDB-C₁₈, 250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 柱温: 20 $^{\circ}$ C; 流动相: 乙腈-水(体积比 2:98); 流速: 0.8 mL/min; 检测波长: 205 nm; 进样量: 10 μ L。

2.3 标准曲线的绘制

丙烯酰胺标准储备液(1.0 mg/mL): 准确称取丙烯酰胺标准品 100.0 mg, 于 100 mL 容量瓶中, 用超纯水完全溶解后定容至刻度, 避光冷藏保存。

标准系列溶液配制: 分别吸取相应体积的标准储备液, 用超纯水稀释成 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 μ g/mL 标准溶液, 过 0.45 μ m 滤膜后, 进行液相色谱检测分析。以丙烯酰胺的质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 建立线性回归方程。

2.4 样品的提取

将高温油炸、烘烤加工的食品(饼干、方便面、麻花、面包、薯片等)用粉碎机粉碎, 过 40 目筛, 称取样品 5.0 g 于 250 mL 烧杯中, 加入 40 mL 超纯水, 磁力搅拌 30 min

后转移至离心管中, 以 8000 r/min 转速离心 20 min。取上清液于分液漏斗中, 加入 10 mL 正己烷充分振荡, 静置分层, 以除去脂溶性物质, 收集下层水样于离心管中, 8000 r/min 转速离心 10 min, 将上清液收集于 50 mL 容量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 待净化用^[13]。

2.5 样品提取液净化

将 C₁₈ 固相萃取小柱在固相萃取仪上安装好, 先用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水活化, 接着加入 5.0 mL 上清液, 用 5 mL 超纯水淋洗, 抽干后, 用 10 mL 流动相乙腈-水(2:98, $V:V$)洗脱, 收集洗脱液。氮吹仪上吹干后, 用 2 mL 超纯水溶解, 用 0.45 μ m 滤膜过滤至样瓶中, 供液相色谱仪检测。

丙烯酰胺计算公式为:

$$X = \frac{C \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \times 1000$$

式中: X —样品中丙烯酰胺的含量, μ g/kg; C —标准曲线中对应的浓度, μ g/mL; V_1 —洗脱液最终定容体积, mL; V_2 —净化用的上清液体积, mL; V_3 —样品提取液总体积, mL; m —样品的质量, g。

3 结果与分析

3.1 流动相的选择

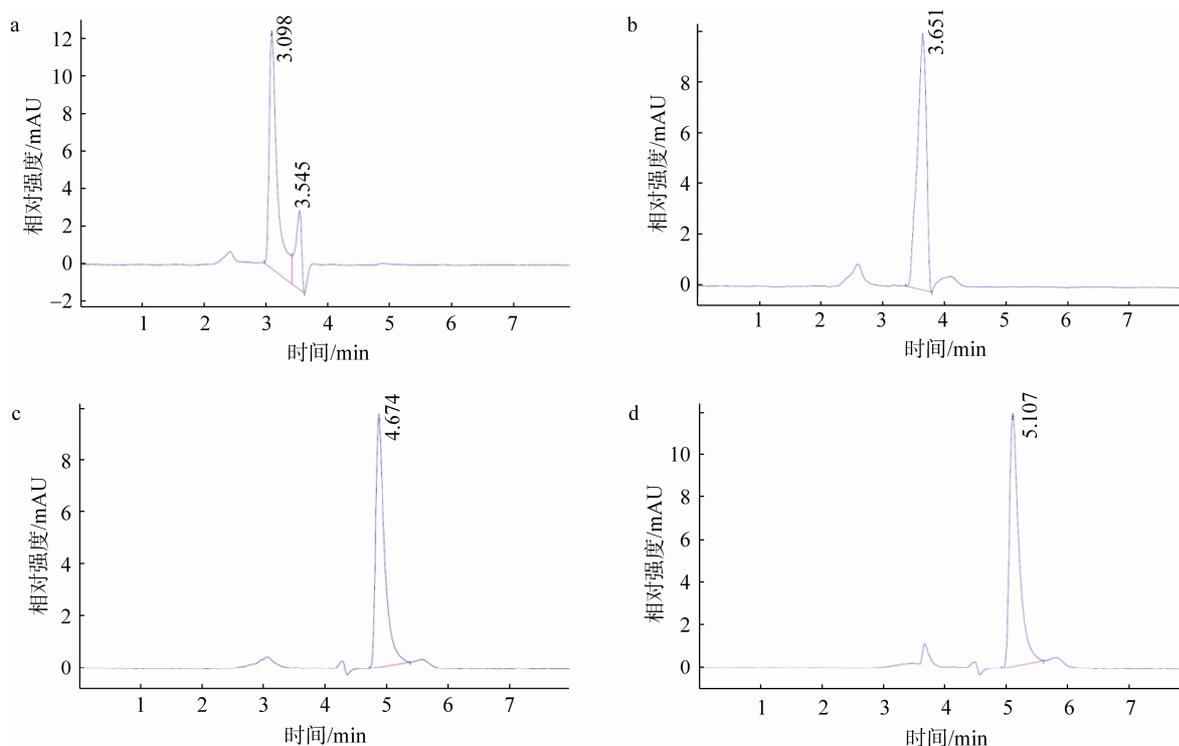
丙烯酰胺是一种极性很强的化合物, 流动相的选择在检测过程中对色谱柱的分离效果有着较大的影响^[14]。本文选用安捷伦反向 C₁₈ 色谱柱, 反向液相色谱常用的流动相有甲醇、乙腈、水和缓冲盐等。而丙烯酰胺能够吸收近紫外光波长, 因此选用紫外吸收较低的乙腈和水作为流动相, 提高检测的灵敏度。

在测定波长 205 nm, 流速 0.8 mL/min, 柱温 20 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L 的条件下, 调节流动相乙腈和水的比例, 体积比 20:80、10:90、5:95、2:98, 测定 1.0 μ g/mL 丙烯酰胺标准溶液的色谱图如图 1 所示。

由图 1 可以看出, 乙腈和水体积比 20:80 时, 目标峰与杂质峰没有很好的分离; 乙腈和水体积比 10:90、5:95 时, 目标峰与杂质峰能够分离, 但峰形相对较差; 当以乙腈:水(2:98)作为流动相时, 目标峰与杂质峰能够达到较好的分离, 干扰峰少, 峰形良好, 检测效果最好。因此, 选择乙腈-水(2:98)作为丙烯酰胺检测的流动相。

3.2 波长的选择

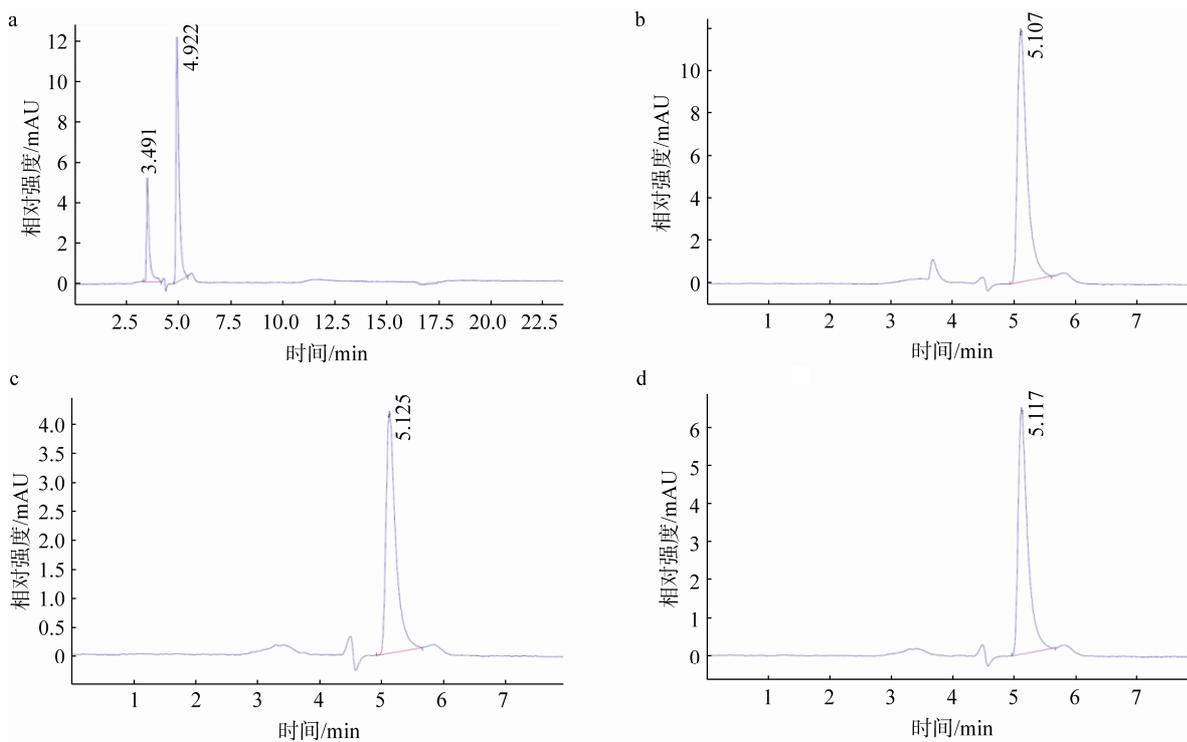
丙烯酰胺在近紫外线 190~250 nm 有吸收, 所以, 在流动相乙腈-水(2:98), 流速 0.8 mL/min, 柱温 20 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L 的条件下, 以波长 200、205、210、215 nm 分别测定 1.0 μ g/mL 丙烯酰胺标准溶液, 色谱图如图 2 所示。



注: a: 乙腈-水(20:80, $V:V$, 下文同); b: 乙腈-水(10:90); c: 乙腈-水(5:95); d: 乙腈-水(2:98)。

图 1 不同比例流动相条件下丙烯酰胺色谱图

Fig.1 Chromatogram of acrylamide with different mobile phase ratio



注: a: 200 nm; b: 205 nm; c: 210 nm; d: 215 nm。

图 2 不同波长条件下丙烯酰胺色谱图

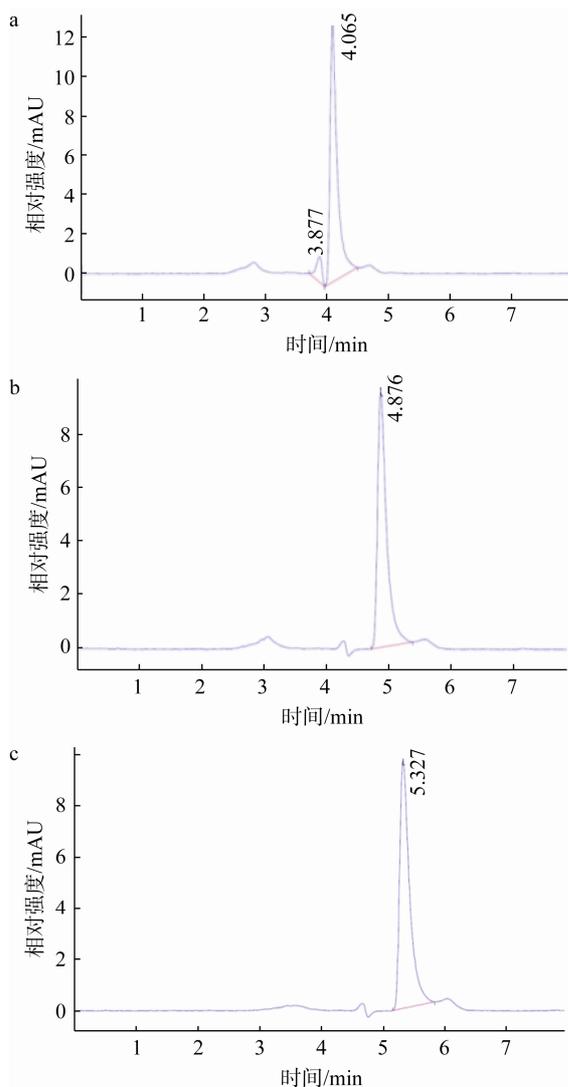
Fig.2 Chromatogram of acrylamide at different wavelengths

结果显示, 波长 200 nm 时, 有杂质吸收峰的影响, 分离效果相对较差, 基线的噪音相对较大。在波长 205、210、215 nm 时, 丙烯酰胺的目标峰和杂质峰能够达到较好的分离, 峰形良好, 但在波长 205 nm 目标峰的响应值最大, 因此, 本研究选择 205 nm 作为丙烯酰胺检测的波长。

3.3 流速的选择

在流动相乙腈-水(2:98), 波长 205 nm, 柱温 20 °C, 进样量 10 μ L 的条件下, 以流速 0.5、0.8、1.0 mL/min 分别测定 1.0 μ g/mL 丙烯酰胺标准溶液的色谱图如图 3 所示。

由图 3 可以看出, 流速 1.0 mL/min 时, 目标峰与杂质峰没有完全分离, 流速为 0.5 mL/min 和 0.8 mL/min 目标峰能够跟杂质峰完全分离, 不受杂质峰的干扰, 从节省时间的考虑, 本研究采用流速 0.8 mL/min。



注: a: 1.0 mL/min; b: 0.8 mL/min; c: 0.5 mL/min。

图 3 不同流速条件下丙烯酰胺色谱图

Fig.3 Chromatogram of acrylamide at different flow rates

综合上述, 最终选定测定丙烯酰胺的色谱条件为: 流动相: 乙腈-水(2:98); 检测波长: 205 nm; 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 20 °C; 进样量: 10 μ L。

3.4 样品固相萃取条件的优化

食品中成分比较复杂, 提取液直接液相色谱检测, 基质干扰大, 会污染色谱柱, 影响目标峰的分离效果, 固相萃取净化可以有效减少杂质并提高丙烯酰胺的回收率, 本实验选用 C_{18} 萃取柱对样品进行纯化处理, 分别用甲醇、水、流动相作为洗脱液, 以质量浓度为 0.1 μ g/mL 的丙烯酰胺标准溶液进行洗脱, 按最终选择的色谱条件检测, 结果见图 4-6。结果表明, 用水作为洗脱液洗脱时, 未检测到目标物丙烯酰胺(图 4); 用甲醇作为洗脱液洗脱时, 色谱图杂峰多干扰大, 样品峰和杂质峰没有分开, 分离度不好(图 5); 用流动相乙腈-水(2:98)作为洗脱液洗脱时, 目标峰和干扰峰可以达到较好的分离, 杂质少干扰小(图 6)。因此, 本研究选择流动相乙腈-水(2:98)作为洗脱液。

3.5 标准曲线的绘制和方法检出限、定量限

按照 2.3 的方法配制 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 μ g/mL 丙烯酰胺标准溶液, 在按上述色谱条件进行检测, 以丙烯酰胺的质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 得到标准曲线。丙烯酰胺标准溶液在 0.1~2.0 μ g/mL 的范围内,

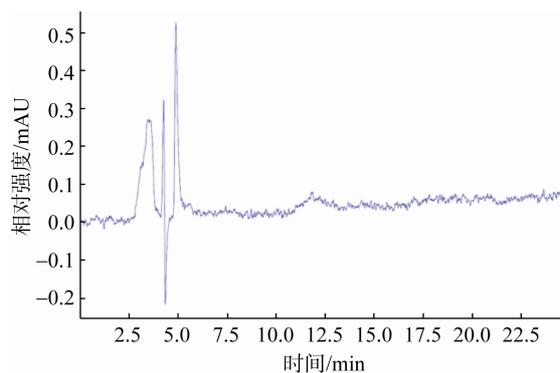


图 4 用水作为洗脱液得到的色谱图

Fig.4 Chromatogram obtained by using water as eluent

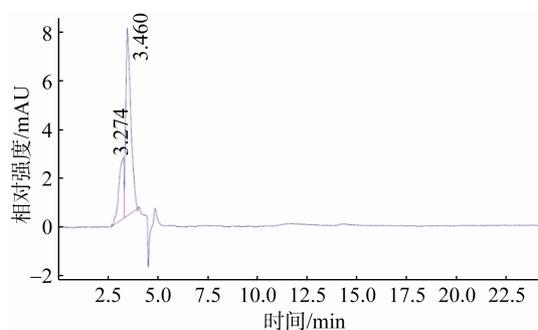


图 5 用甲醇作为洗脱液得到的色谱图

Fig.5 Chromatogram obtained with methanol as eluent

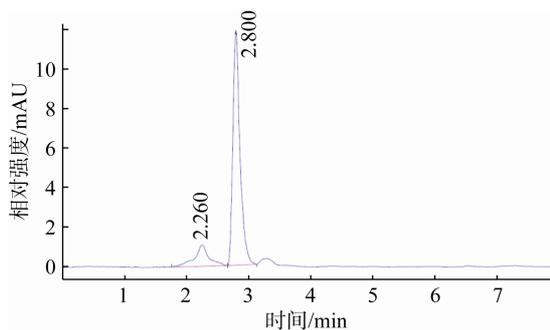


图 6 用流动相作为洗脱液得到的色谱图

Fig.6 Chromatogram obtained by using mobile phase as eluent

保持良好的线性关系, 得到线性回归方程 $Y=87.539X+5.5644$, $r^2=0.9987$ 。

取 6 份等量的饼干样品, 按照 2.4 样品提取方法、2.5 样品净化方法和选定色谱条件进行检测, 以 3 倍信噪比($S/N=3$)、10 倍信噪比($S/N=10$)峰面积对应丙烯酰胺的含量计算方法的检出限、定量限, 分别为 $14 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $40 \mu\text{g}/\text{kg}$, 方法灵敏度高。

3.6 仪器精密度

将 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 丙烯酰胺标准溶液按最终选择的色谱条件进行检测分析, 重复进样 6 次, 结果见表 1。6 次进样的峰面积平均值为 96.8, 相对标准偏差为(relative standard deviation, RSD)为 0.16%, 重复性较理, 满足定量的基本要求。

表 1 丙烯酰胺精密度实验结果($n=6$)

序号	1	2	3	4	5	6
峰面积	96.9	96.5	96.9	96.9	97.0	96.7
平均值	96.8					
RSD/%	0.16					

3.7 加标回收率实验

以市售饼干作为基质样品, 在选定的色谱条件下, 进行加标回收实验, 以外标法定量, 向基质样品中添加低、中、高 3 个浓度水平的丙烯酰胺标准溶液, 每个浓度平行测定 3 次, 计算平均回收率和相对标准偏差, 结果见表 2。结果表明, 本方法的加标回收率在 91.5%~95.0%之间, 相对标准偏差均小于 5%, 说明该方法回收率和精密度良好, 具有可靠的检测性能。

3.8 实际样品测定

食品中的丙烯酰胺主要在高碳水化合物、低蛋白质的植物性食品高温加热过程中形成的。从市面上随机购买 6 种高温加工的食品(饼干、方便面、麻花、面包、薯片等)

按 2.4 样品提取和 2.5 样品净化的方法进行样品预处理, 根据选定的液相色谱条件进行检测, 每个样品平行测定 3 次, 取平均值, 结果如表 3 所示。由所测定样品的结果可以看出, 面包中的丙烯酰胺含量最低, 饼干、麻花、方便面等次之, 薯片中丙烯酰胺含量最高。

表 2 加标回收率测定结果($n=3$)

加标前含量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	加标后含量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	平均回收率/%	RSD/%
240	50	285.8	91.5	1.46
240	100	332.5	92.5	1.86
240	200	430.0	95.0	2.00

表 3 实际样品中丙烯酰胺的含量

编号	样品名称	丙烯酰胺/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
1	饼干	220
2	方便面	423
3	麻花	172
4	面包 1	81
5	薯片	688
6	面包 2	66

4 结论

本研究建立了测定高温加工食品中丙烯酰胺的液相色谱分析方法。结果表明, 样品粉碎后经超纯水提取、正己烷脱脂、 C_{18} 固相萃取柱萃取、流动相洗脱后得到样品净化液, 以乙腈-水(2:98)作为流动相, 流速为 $0.8 \text{ mL}/\text{min}$, 测定波长 205 nm , 柱温 $20 \text{ }^\circ\text{C}$, 得到的丙烯酰胺色谱图峰形良好, 分离效果最佳。在该色谱条件下, 丙烯酰胺在 $0.1\sim 2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 内具有良好的线性关系。该检测方法操作简便、稳定、可靠, 有助于高温加工的淀粉类食品中丙烯酰胺的检测和监控。

参考文献

- [1] Stadler RH, Scholz G. Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control [J]. *Nutr Rev*, 2004, 62(12): 449-467.
- [2] Allen B, Zeige RE, Lawrence G, *et al*. Dose response modeling of *in vivo* genotoxicity data for use in risk assessment: Some approaches illustrated by an analysis of acrylamide [J]. *Regulat Toxicol Pharmacol*, 2005, 41(1): 6-27.
- [3] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, *et al*. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50(17): 4998-5006.
- [4] 张中兴, 唐雯, 许蕊, 等. 蛋糕中丙烯酰胺的产生温度及全豆浆对其影响的研究[J]. *食品与发酵科技*, 2020, 56(4): 36-39.

- Zhang ZX, Tang W, Xu R, *et al.* Study on the production temperature of acrylamide in cake and the effect of whole soybean milk on it [J]. *Food Ferment Sci Technol*, 2020, 56(4): 36–39.
- [5] Mestdagh FJ, De Meulenaer B, Van Peteghem C, *et al.* Influence of oil degradation on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries [J]. *Food Chem*, 2007, 93(3): 1153–1159.
- [6] Becalski A, Lau BP, Lewis D, *et al.* Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(3): 802–808.
- [7] Chen M, Hsu H, Lin C, *et al.* A statistical regression model for the estimation of acrylamide concentrations in French fries for excess lifetime cancer risk assessment [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(10): 3867–3876.
- [8] 戴煌, 唐天昊, 陈柯君, 等. 食品中丙烯酰胺检测方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(14): 329–335.
- Dai H, Tang TH, Chen KJ, *et al.* Research progress of detection methods of acrylamide in food products [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(14): 329–335.
- [9] 王祖文, 丁晓雯. 食品中丙烯酰胺检测技术研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2019, (1): 1–9.
- Wang ZW, Ding XW. Research progress on detection technology of acrylamide in food [J]. *Food Ferment Ind*, 2019, (1): 1–9.
- [10] 李青叶. 基于 Fe_3O_4 磁性纳米材料的传感器用于丙烯酰胺检测的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2018.
- Li QY. Study on the detection of acrylamide based on Fe_3O_4 magnetic nano material sensor [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2018.
- [11] 石声鑫. 食品中丙烯酰胺的测定及其含量控制方法[J]. *现代食品*, 2016, (24): 121–125.
- Shi SX. Determination and the control methods of acrylamide in food [J]. *Mod Food*, 2016, (24): 121–125.
- [12] GB 5009.204-2014 食品安全国家标准 食品中丙烯酰胺的测定[S]. GB 5009.204-2014 National food safety standard-Determination of acrylamide in food [S].
- [13] 陈煜, 龚号迪, 张龔, 等. 油炸食品中丙烯酰胺的检测方法研究[J]. *中国油脂*, 2019, 44(9): 128–132.
- Chen Y, Gong HD, Zhang Y, *et al.* Determination of acrylamide in fried foods by high-performance liquid chromatography [J]. *China Oil Fats*, 2019, 44(9): 128–132.
- [14] 李河山. 烹饪食物中丙烯酰胺的检测及变化规律[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(19): 134–138.
- Li HS. Determination and change rule of acrylamide in cooking food [J]. *Food Res Dev*, 2017, 38(19): 134–138.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



战旭梅, 硕士, 讲师, 主要研究方向食品研究开发、食品检测。
E-mail: 1643802259@qq.com



刘萍, 博士, 副教授, 主要研究方向为功能性食品。
E-mail: 12404989@qq.com