

### 3 结论

本实验建立用微波消解-碰撞反应池技术电感耦合等离子体质谱法测定粮食硒的方法。和仲裁法相比,本法操作简便、快速、干扰消除完全、分析结果稳定、准确度好以及不使用有毒有害试剂;提高了测定样品的灵敏度、降低了检出限,而精密度(相对标准偏差)、准确度(回收率)的结果和仲裁法一致,经统计学配对资料差数秩和检验分析没有显著性差异,对3个标准参考物质的分析结果与参考值相符。

### 参考文献

- [1] 白燕,秦碧霞,刘莺,等. 含硒含硫氨基酸清除超氧阴离子自由基的研究[J]. 营养学报,2009,31(1):407-408.
- [2] 裴俊瑞,王铜,周令望,等. 硒和维生素E对甲状腺及其激素代谢的影响[J]. 营养学报,2009,31(4):381-384.

- [3] 夏舜明. 中国人体硒营养研究回顾[J]. 营养学报,2011,33(4):329-334.
- [4] 安利峰. 硒的功能及其相关疾病[J]. 国外医学医学地理分册,2005,26(2):56-57.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 5009.93—2010 食品安全国家标准食品中硒的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
- [6] 刘虎生,邵宏翔. 电感耦合等离子体质谱技术与应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [7] 铁梅,臧树良,张威,等. ICP-MS测定食用菌中硒的方法研究[J]. 光谱学与光谱分析,2006,26(3):551-553.
- [8] 何毅,孙鹤,陈玉红,等. 带八极杆碰撞反应池的电感耦合等离子体质谱(ORS-ICP/MS)法直接测定血清中的痕量硒和碘[J]. 环境化学,2011,30(9):1680-1682.
- [9] 谢建滨,张慧敏,黎雪慧,等. 直接进样碰撞池ICP-MS技术测定全血中二十种元素[J]. 中国热带医学,2009,9(8):1455-1456.
- [10] 意大利 milestone 公司微波消解仪 ETHOS 1/A 系列操作手册[M]. 2010:25-28.

## 实验技术与方法

# 固相萃取-高效液相色谱法检测油炸薯条中丙烯酰胺

王吉,李彧娜

(苏州赛分科技有限公司应用技术研究中心,江苏苏州 215123)

**摘要:**目的 建立了一种采用固相萃取-高效液相色谱(SPE-HPLC)测定油炸薯条中丙烯酰胺的方法。方法 样品用2.0 mol/L氯化钠溶液进行提取,使用Styre Screen H2P固相萃取柱(200 mg/3 ml)净化,然后用Sapphire C<sub>18</sub>反相色谱柱进行分析,流动相为甲醇/水(5:95),流速为1.0 ml/min,检测波长为200 nm。结果 在1.0~10.0 μg/g的添加水平范围内,样品中丙烯酰胺的平均回收率为66.2%~80.9%,相对标准偏差为1.6%~2.1%,最低检测限和最低定量限分别为0.025和0.080 μg/g。结论 该方法操作简单、快速、准确,可用于油炸薯条中丙烯酰胺的快速测定。

**关键词:**固相萃取; 高效液相色谱; 油炸薯条; 丙烯酰胺; 食品污染物; 食品安全

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2012)05-0445-04

## Determination of acrylamide in French fries using solid phase extraction and high performance liquid chromatography

Wang Ji, Li Yuna

(Application Technology Research Center, Suzhou Sepax Technologies, Ltd, Jiangsu Suzhou 215123, China)

**Abstract: Objective** To develop a method for determination of acrylamide in French fries using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was extracted with aqueous solution of 2.0 mol/L sodium chloride, and cleaned up by a Styre Screen H2P SPE cartridge (200 mg/3 ml), then analyzed by a Sapphire C<sub>18</sub> reverse phase column with methanol/water (5:95, V/V) as mobile phase at the flow rate of 1.0 ml/min and the wavelength of 200 nm. **Results** The result showed that the average recoveries were between 66.2% and 80.9% in the range of 1.0 - 10.0 μg/g, and the relative standard deviations (RSDs) were between 1.6% and 2.1%, with a LOD (limit of detection) of 0.025 μg/g and LOQ (limit of quantification) of 0.080 μg/g. **Conclusion** This method was simple, fast, precise and could be used for rapid determination of acrylamide in French fries.

**Key words:** Solid phase extraction (SPE); high performance liquid chromatography; French fries; acrylamide; food contaminants; food safety

收稿日期:2012-05-22

作者简介:王吉 男 硕士 研究方向为固相萃取和液相色谱应用技术开发 E-mail:wangji182000@163.com

油炸薯条是深受大众喜爱的食品之一,然而,据研究报道,淀粉类食品在高温烹调下很容易产生丙烯酰胺,特别是薯类油炸食品中丙烯酰胺平均含量高出于谷类油炸食品4倍。丙烯酰胺被国际癌症研究署(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为“人类可能致癌物”<sup>[1]</sup>,具有潜在的神经毒性<sup>[2]</sup>、遗传毒性<sup>[3]</sup>和致癌性<sup>[4]</sup>。2005年4月13日我国卫生部发布了建议消费者避免食用油炸薯片和油炸薯条的公告,呼吁采取措施减少食品中丙烯酰胺可能导致的健康危害<sup>[5]</sup>。

目前国际上食品中丙烯酰胺检测方法主要为气相色谱-质谱(GC-MS)联用法<sup>[6-7]</sup>和液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法<sup>[8-10]</sup>。然而,GC-MS法须进行加溴衍生化,样品前处理方法繁琐;LC-MS/MS法所需仪器非常昂贵。

固相萃取技术作为一种重要的样品前处理技术,具有操作简单、提取效率高和净化效果好等特点,现已广泛用于化学痕量分析过程中。目前文献报道用于丙烯酰胺样品净化的固相萃取柱有C<sub>18</sub><sup>[11]</sup>、HLB<sup>[10]</sup>、石墨化碳黑<sup>[12]</sup>和离子交换柱<sup>[13]</sup>等。本文在参考文献报道的基础上,对几种固相萃取方法进行了比较,并建立了一种快速、简便、净化效果好的固相萃取-高效液相色谱法分析油炸薯条中丙烯酰胺的方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪,包括400泵系统、486检测器、996 PDA 光二极管阵列检测器、717自动进样器和Millennium32工作站;Styre Screen® H2P(200 mg/3 ml)、Clean Up® C<sub>18</sub>(200 mg/3 ml)、Clean Up® 石墨化碳黑(200 mg/3 ml)、离子交换混合柱(C<sub>18</sub>、BCX、QAX各100 mg,均匀混合,3 ml)固相萃取柱,Glass Block Manifold固相萃取装置;丙烯酰胺标准品(纯度不低于98.5%);Milli-Q超纯水系统;甲醇(色谱纯);氯化钠(分析纯);油炸薯条购自超市。

### 1.2 色谱分析条件

色谱柱:Sepax Sapphire C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温:25 °C;检测波长:200 nm;流动相:甲醇/水(5:95);流速:1 ml/min;进样体积:20 μl;外标法定量。

### 1.3 标准溶液的配制

准确称取5.0 mg丙烯酰胺标准品于5 ml容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配制成1 mg/ml丙烯酰胺标准储备液,-20 °C存放。取上述储备液适量,用5%甲醇水溶液分别配制2.00、1.50、1.00、

0.50、0.25、0.10、0.02、0.005 μg/ml等一系列浓度工作溶液,按照色谱条件进行测定,每一浓度测定3次,以峰面积平均值与对应工作溶液浓度作标准曲线。

### 1.4 样品处理

准确称取2.0 g粉碎均匀的样品,加入10 ml 2 mol/L的氯化钠溶液,振荡提取30 min。然后在3 500 r/min下离心15 min,避开上面油层吸取上清液,经0.45 μm滤膜过滤,待净化。

取200 mg/3 ml的H2P固相萃取柱,依次加入2 ml甲醇、2 ml去离子水进行活化,取1 ml提取液上样,然后加入0.5 ml去离子水,待其流出柱子后加入约3 ml 5%甲醇水溶液并开始收集,弃去前面0.5 ml流出液,再收集后面的1 ml流出液,经0.45 μm滤膜过滤后直接进样HPLC进行分析。在整个固相萃取过程中,当前一步溶剂刚好流出SPE柱时,立即加入下一步溶剂,不抽干,流速保持在0.5 ml/min左右。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的确定

对于丙烯酰胺的液相色谱分析,文献多采用C<sub>18</sub>色谱柱,本文采用Sapphire C<sub>18</sub>柱,在“1.2”节的条件下获得良好的峰形,如图1所示,丙烯酰胺的保留时间为5.9 min。通过二极管阵列检测器测得的丙烯酰胺目标峰的全波段光谱图显示丙烯酰胺的最大吸收波长在190 nm到200 nm之间,然后用486检测器分别分析测得在190、200、210、220 nm波长下的丙烯酰胺标准溶液色谱图,结果显示,在190和200 nm下丙烯酰胺的吸收值最高,但是在190 nm下基线噪音比较大,故最后选择200 nm作为检测波长。

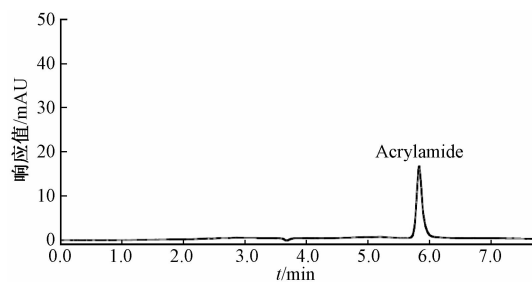


图1 浓度为1.0 μg/ml丙烯酰胺标准溶液色谱图  
Figure 1 Chromatogram of 1.0 μg/ml acrylamide standard solution

### 2.2 线性关系与检测限

丙烯酰胺在0.02~2.00 μg/ml之间,峰面积和质量浓度呈良好的线性关系,回归方程为 $y = 113\,368x - 951.8$ ,线性相关系数为 $R^2 = 0.999\,3$ 。

丙烯酰胺的最低检出量按 $S/N$ 为2~3计算为0.1 ng。在“1.4”方法下,2 g样品用10 ml溶剂进行

提取,净化后体积不变,以此计算,其最低检测限相当于  $0.025 \mu\text{g/g}$ ,最低定量限相当于  $0.080 \mu\text{g/g}$ 。

### 2.3 提取方法的选择

丙烯酰胺极易溶于水,在  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  水中溶解度为  $2115 \text{ g/L}$ ,因此,水是理想的提取剂,如文献[10-13]均采用直接水提的方法。Young 等<sup>[14]</sup>曾报道使用  $2 \text{ mol/L}$  氯化钠水溶液来提取油炸薯类食品中的丙烯酰胺。实验发现,如果直接用水提取,容易发生乳化现象,一般需要较高的转速才能将固体与液体完全分开,而采用  $2 \text{ mol/L}$  的氯化钠水溶液进行提取时,可以避免发生乳化,在较低的转速(如  $3500 \text{ r/min}$ )下即可获得有效的固液分离。色谱分析结果显示用  $2 \text{ mol/L}$  的氯化钠水溶液提取的样品要比用水提取的样品更加干净,且不影响回收率。

### 2.4 净化方法的比较和优化

目前用于丙烯酰胺样品净化的固相萃取柱有  $\text{C}_{18}$  柱、Oasis HLB、石墨化碳黑柱、离子交换柱等,本研究分别按照文献[10-13]的方法使用  $\text{C}_{18}$  柱、H2P(对应 HLB 柱)、石墨化碳黑柱、离子交换柱等对丙烯酰胺样品进行处理,并比较它们的净化效果。实验结果表明,丙烯酰胺在  $\text{C}_{18}$  柱上几乎没有保留,这与文献报道一致,而在本色谱条件下影响丙烯酰胺检测的主要干扰是极性杂质(如图 2 所示),因此  $\text{C}_{18}$  柱无法满足样品净化目的。丙烯酰胺在石墨化碳黑柱上的吸附很强,但是很多杂质在石墨化碳黑上也有普遍的吸附,并随着丙烯酰胺一起被甲醇洗脱下来,因此净化效果并不理想。离子交换柱在去除杂质过程中效果并不明显。丙烯酰胺在 H2P 柱上有一定的保留作用,因此最后选择 H2P 柱作进一步的方法优化。

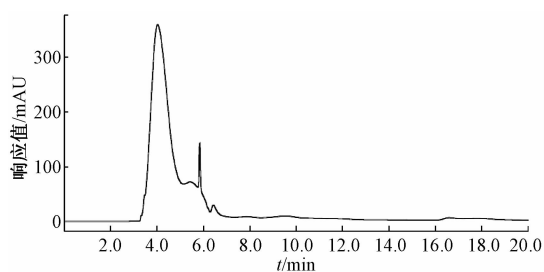


图 2 净化前样品提取液色谱图

Figure 2 Chromatogram of sample extract before clean up

H2P 固相吸附剂是一种亲水疏水双重聚合物吸附剂,与  $\text{C}_{18}$  相比,对于极性分子具有更好的保留作用。丙烯酰胺在 H2P 柱上的保留仍比较弱,水即可洗脱。实验中,首先选择水作为洗脱剂进行研究。与甲醇乙腈等洗脱剂相比,选择洗脱强度很弱的水为洗脱溶剂的优点是可大大降低非极性杂质从柱上的洗脱,使处理过的样品比较干净,减少在

液相色谱测定过程中对色谱柱的污染,尤其是在流动相为 5% 甲醇水溶液的条件下,缺点是对样品进行浓缩比较困难。图 3 是  $1.0 \mu\text{g/ml}$  丙烯酰胺标准液在 H2P 柱上的水淋洗曲线,该淋洗曲线显示丙烯酰胺在 H2P 上有较好的保留,但随后用  $1 \text{ ml}$  水进行淋洗时会有较大的损失,这也间接说明了难以进一步提高上样体积,丙烯酰胺从 H2P 柱上完全洗脱需要约  $4 \text{ ml}$  的水。实际样品的水淋洗曲线显示,容易干扰丙烯酰胺分析的极性杂质主要集中在最初的  $0.5 \sim 1.0 \text{ ml}$  洗出液中。

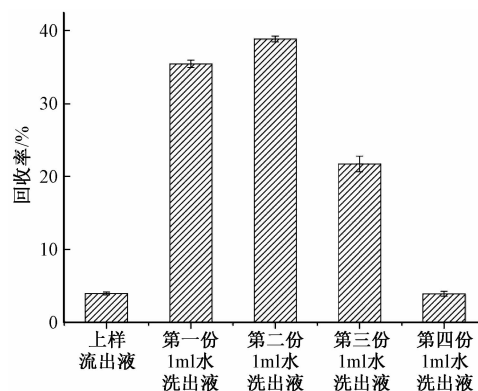


图 3 丙烯酰胺在 H2P 柱上的水淋洗曲线

Figure 3 Elution curve of acrylamide by water on H2P cartridge

根据以上情况逐步细调,最终将固相萃取方法调整如下:以  $0.5 \text{ ml}$  水作为淋洗液,减少丙烯酰胺在淋洗过程中的损失;以洗脱强度更强一些的 5% 甲醇水溶液作为洗脱剂,减少洗脱体积,最大限度地提高样品中待测物质的浓度。实验结果显示,通过以上方法可有效地去除低保留的干扰物质, $1 \text{ ml}$  5% 甲醇可将丙烯酰胺完全洗脱下来,图 4 和图 5 分别是添加了  $5.0$  和  $1.0 \mu\text{g/g}$  丙烯酰胺标准品并通过上述方法净化处理过的样品色谱图,图 6 是未添加的净化后样品色谱图,并检测到实际样品中所含有的本底值为  $0.113 \mu\text{g/g}$ ,与文献[15]报道一致。

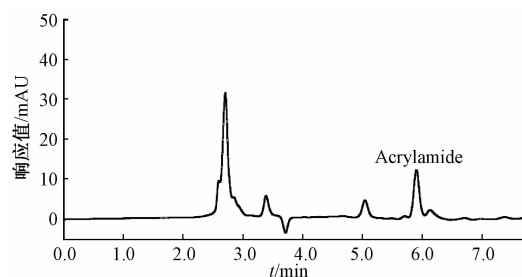


图 4 加标  $5.0 \mu\text{g/g}$  并经 H2P 柱净化后的样品色谱图

Figure 4 Chromatogram of spiked sample cleaned up by H2P cartridge ( $5.0 \mu\text{g/g}$ )

### 2.5 回收率实验

准确称取  $2.00 \text{ g}$  粉碎均匀的油炸薯条样品,加

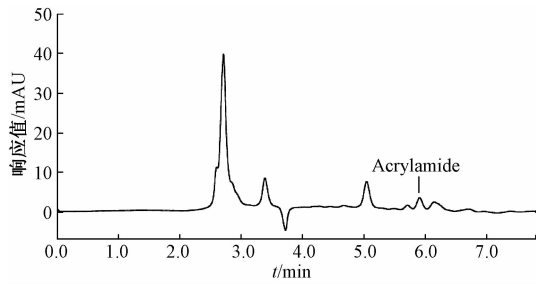


图5 加标 1.0 μg/g 并经 H2P 柱净化后的样品色谱图  
Figure 5 Chromatogram of spiked sample cleaned up by H2P cartridge (1.0 μg/g)

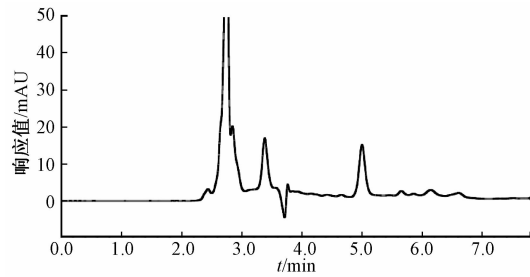


图6 无添加的经 H2P 柱净化后的样品色谱图  
Figure 6 Chromatogram of blank sample cleaned up by H2P cartridge

入一定量丙烯酰胺标准品,使样品添加浓度分别为 10.0、5.0 和 1.0 μg/g,按照优化后的方法对样品进行提取和净化处理,然后用 HPLC 进行测定,扣除本底值后,计算回收率,结果如表 1 所示。从表中可以看出,在 10.0、5.0 和 1.0 μg/g 这 3 个添加水平下,丙烯酰胺的平均回收率在 66.2% ~ 80.9% 之间,相对标准偏差在 1.6% ~ 2.1% 之间,说明本方法具有较好的可靠性和重现性。

表 1 加标回收试验结果

Table 1 Result of recovery with standard

添加浓度 (μg/g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
10.0	80.4	80.9	1.6
	79.9		
	81.4		
	82.0		
	78.6		
	83.0		
5.0	65.1	66.2	1.6
	68.7		
	67.5		
	64.7		
	65.1		
	66.1		
1.0	77.3	75.4	2.1
	74.4		
	74.5		
	77.3		
	77.0		
	72.1		

### 3 结论

本文建立了油炸薯条中痕量丙烯酰胺的固相萃取-高效液相色谱分析方法。该方法操作简便、快速,结果准确可靠,检出限低,检测成本较低。其中采用 H2P 柱的固相萃取方法可较好地除去干扰杂质,大大提高样品的净化程度,保证待测物质的准确测定。本方法采用 HPLC-UVD 进行测定,对所需仪器要求较低,可在大多数实验室中进行。因此,该方法具有较好的推广价值。

### 参考文献

- [1] IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans [C]. Lyons: International Agency for Research on Cancer, 1994, 60: 389.
- [2] LOPACHIN R M, LEHNING E J. Acrylamide-induced distal axon degeneration; a proposed mechanism of action [J]. Neurotoxicology, 1994, 15: 247-259.
- [3] ALLEN B, ZEIGER E, 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: 6-27.
- [4] RICE J M. The carcinogenicity of acrylamide [J]. Mutat Res/ Genet Toxicol Environm Mutagen, 2005, 580: 3-20.
- [5] 卫生部. 中华人民共和国卫生部公告 2005 年第 4 号 [S]. 2005.
- [6] 宋莉晖, 杨成对. 食品中丙烯酰胺含量的分析方法研究 [J]. 分析检验, 2005, 26(6): 203-205.
- [7] 邓晓军, 胡国华, 朱坚. 气相色谱-离子阱二级质谱测定食品中丙烯酰胺残留 [J]. 理化检验 (化学分册), 2007, 43(4): 256-259.
- [8] 刘红河, 陈春晓, 柳其芳, 等. 食品中致癌物丙烯酰胺的固相萃取-高效液相色谱联用测定方法 [J]. 职业与健康, 2004, 20(10): 5-7.
- [9] 张琪, 张琦, 栾燕, 等. HPLC-MS/MS 测定油炸及高温烘烤食品中的丙烯酰胺 [J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(1): 5-9.
- [10] 章宇, 焦晶晶, 张英, 等. 液相色谱-串联质谱法测定焙烤和油炸食品中丙烯酰胺的含量 [J]. 中国食品学报, 2007, 7(1): 131-137.
- [11] 柳其芳, 吕玉琼, 黎雪慧, 等. 二极管阵列检测高效液相色谱法测定食品中丙烯酰胺的研究 [J]. 中国热带医学, 2005, 5(6): 1186-1188.
- [12] SN/T 2096—2008 食品中丙烯酰胺的检测方法同位素内标法 [S].
- [13] ROSÉN J, HELLENÄS K E. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass [J]. Analyst, 2002, 127: 880-882.
- [14] YOUNG M S, JENKINS K M, MALLET C R. Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 2004, 87: 961-964.
- [15] 楼方贺, 吴平谷. 食品中丙烯酰胺危害的研究进展 [J]. 浙江预防医学, 2010, 22(7): 16-23.