

固相萃取-高效液相色谱法检测油炸猪肉中丙烯酰胺

邵美丽¹, 郝星宇¹, 刘巍^{1,2}, 崔承远¹, 袁兆丰¹, 董鑫¹

(1.东北农业大学食品学院, 哈尔滨 黑龙江 150030; 2.佳木斯出入境检验检疫局, 黑龙江 佳木斯 154002)

摘要:建立油炸猪肉中丙烯酰胺的固相萃取-高效液相色谱检测方法。油炸猪肉样品经正己烷脱脂, 2 mol/L氯化钠溶液提取, 乙酸乙酯萃取, 固相萃取小柱净化后, 以甲醇-水(5:95, V/V)为流动相, Hypersil10DS₂-C₁₈色谱柱分离, 内标法定性、定量分析丙烯酰胺。结果表明: 丙烯酰胺的定性检出限为6 μg/kg, 定量检出限为20 μg/kg, 线性定量范围0.05~1.00 μg/mL, 线性相关系数(R^2)为0.999 8, 本方法的加标回收率稳定在90%~92%范围, 相对标准偏差小于3.5%。

关键词:油炸猪肉; 丙烯酰胺; 固相萃取; 高效液相色谱

Determination of Acrylamide in Deep-Fried Pork by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography

SHAO Meili¹, HAO Xingyu¹, LIU Wei^{1,2}, CUI Chengyuan¹, YUAN Zhaofeng¹, DONG Xin¹

(1. College of Food Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Jiamusi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiamusi 154002, China)

Abstract: A method for the determination of acrylamide in deep-fried pork has been proposed using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC). Samples were degreased with *n*-hexane and extracted sequentially with 2 mol/L sodium chloride solution followed by ethyl acetate. Then the extract was cleaned up on an Oasis HLB solid phase extraction column and separated on a Hypersil10DS₂-C₁₈ chromatographic column with a mobile phase consisting of methanol and water (5:95, V/V). Acrylamide was analyzed quantitatively by internal standard method. The results showed that the limit of qualitative detection of the proposed method was 6 μg/kg, and the limit of quantitative detection was 20 μg/kg. The standard curve was linear within the range of 0.05–1.00 μg/mL with a correlation coefficient of 0.999 8. The recoveries of the spiked sample ranged between 90% and 92% with a relative standard deviation (RSD) lower than 3.5%. This method proved to be simple, fast and highly sensitive.

Key words: deep-fried pork; acrylamide; solid-phase extraction; high performance liquid chromatography

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2015)08-0231-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201508043

丙烯酰胺是一种不饱和酰胺, 具有神经毒性、生殖毒性、遗传毒性及潜在致癌性^[1-4]。研究表明, 不仅在富含碳水化合物的高温油炸食品中含有大量的丙烯酰胺^[5-6], 烧烤、油炸的肉类如烤羊肉串(23 μg/kg)、油炸鸡翅(214 μg/kg)及煎牛排(251 μg/kg)等食品中也含有一定量的丙烯酰胺^[7-9]。在我国, 猪肉是最常食用的一种肉类, 油炸更是人们常用的一种烹饪方式, 建立油炸猪肉中丙烯酰胺的检测方法及安全限量, 对于避免因过多摄入油炸猪肉而引发丙烯酰胺蓄积毒性是非常有必要的。

食品中丙烯酰胺的检测方法主要有气相色谱法、气相色谱-串联质谱法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法^[10-13]等。其中气相色谱-串联质谱法和液相色谱-串联质谱法既有色谱对化合物的分离能力, 又有质谱特异性, 具有检出限低(食品中丙烯酰胺的最低检出限可达1 μg/kg), 灵敏度高, 且能够提供测量组分的分子质量和结构信息等特点。但这两种方法的缺点是所用到的仪器价格非常昂贵, 检测费用高, 且气相色谱-质谱法的样品需先经过衍生化, 操作比较复杂, 不适用于大规模的推广^[14-17]。与其相比, 高效液相色谱法对仪器要求不高, 检测成本

收稿日期: 2014-07-04

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C201303); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541045);

“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD28B00-01-02)

作者简介: 邵美丽(1974—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品安全控制。E-mail: shml0915@163.com

低, 且具有较好的分离效果和较低的检出限, 适于大规模推广^[18]。固相萃取技术是目前常用的样品前处理方法, 其操作简单, 富集效率较高^[19-21]。故本研究结合固相萃取技术, 建立油炸猪肉中丙烯酰胺的高效液相色谱检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

新鲜猪肉 哈尔滨市购。

丙烯酰胺标准品 (纯度 $\geq 99\%$)、甲基-丙烯酰胺标准品 (纯度 $\geq 98\%$) 美国Sigma公司; 甲醇 (色谱纯) 百灵威科技有限公司; 乙酸乙酯、正己烷、环己烷、氯化钠、石油醚 (均为分析纯) 天津市天力化学试剂有限公司。

2487高效液相色谱系统、Oasis HLB固相萃取柱 美国Waters公司; Hypersil10DS₂-C₁₈色谱柱 大连伊力特分析仪器有限公司; 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; QF-3800氮气吹干仪 北京博峰天成科技有限公司; YZ-1531-B多功能油炸锅 广东容声电器股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

1.2.1.1 提取

取10 g粉碎后的油炸猪肉样品, 加入0.01 mg/mL甲基丙烯酰胺内标液500 μ L, 然后加入40 mL正己烷, 超声振荡脱脂15 min, 弃去正己烷层, 重复此操作2次。然后加入50 mL 2 mol/L氯化钠溶液, 磁力搅拌20 min, 以8 000 r/min的转速离心15 min, 取上清液, 重复此操作2次。向上清液加入10 mL乙酸乙酯, 静置10 min后, 收集上层溶液, 重复此操作2次。将收集到的萃取液, 氮气吹干, 加入3 mL超纯水溶解, 备用。

1.2.1.2 净化

依次用3 mL甲醇和3 mL超纯水活化平衡Oasis HLB固相萃取柱, 然后将上述样品提取液过Oasis HLB固相萃取柱, 弃去流出液, 再用3 mL超纯水洗脱, 收集全部洗脱液, 用0.45 μ m滤膜过滤后进行色谱分析。

1.2.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil10DS₂-C₁₈色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 进样量: 20 μ L; 进样温度: 30 $^{\circ}$ C; 流速: 0.8 mL/min; 流动相: 甲醇-水 (5:95, V/V); 检测波长: 205 nm, 利用保留时间定性, 峰面积定量。

1.2.3 标准曲线的绘制

配制1 mg/mL的丙烯酰胺储备液, 进一步稀释得0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.4、0.6、0.8、1 μ g/mL的

丙烯酰胺标准溶液。同时以0.1 μ g/mL甲基丙烯酰胺作内标溶液。依次测定不同质量浓度丙烯酰胺及其内标的峰面积, 以丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺内标的质量浓度比为横坐标, 以丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺内标的峰面积比为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算丙烯酰胺含量。

1.3 数据分析

数据采用Statistix 8.1软件包中Linear Models程序进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

丙烯酰胺是极性很强的化合物, 因此在进行色谱分离时流动相的选择非常重要^[22]。本研究比较了6种不同体积分数的甲醇溶液 (0%、5%、25%、50%、75%、100%) 作为流动相的分离效果。结果表明, 以纯水和纯甲醇为流动相时, 没有出现色谱峰; 以25%、50%、75%的甲醇溶液作流动相时, 甲基丙烯酰胺的峰形较差, 同时以50%的甲醇溶液做流动相时, 基线较不稳定。而以5%的甲醇溶液作为流动相时, 丙烯酰胺的保留时间和峰形都较理想, 基线平稳且无明显漂移的现象, 色谱峰的分离效果也比较好 (色谱图略)。故最终选择5%的甲醇溶液作流动相。

2.1.2 进样温度的选择

本实验比较了20、30、40 $^{\circ}$ C 3个不同进样温度对丙烯酰胺分离效果的影响。结果表明, 3个温度条件下色谱峰的保留时间差别不大。但进样温度为20 $^{\circ}$ C时, 色谱图的基线不够平稳; 进样温度为40 $^{\circ}$ C时, 丙烯酰胺色谱峰分离效果不好, 故选择30 $^{\circ}$ C作为最佳的进样温度 (色谱图略)。

2.1.3 检测波长的选择

丙烯酰胺的检测波长文献报道不一致, 其中最大波长可达260 nm^[23], 而所述最小仅197 nm^[24]。为提高方法的灵敏度和准确性, 在进样前先采用紫外-可见分光光度计对1 μ g/mL的丙烯酰胺标准液以及0.1 μ g/mL的甲基丙烯酰胺内标液在190~350 nm波长范围内进行吸光度全扫描, 结果显示在波长为205 nm左右时有最大吸收波长。故本研究分别比较200、205、210 nm 3个波长条件下丙烯酰胺的分离检测效果。结果表明, 在所选的3个检测波长条件下, 丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺均有最大吸收峰, 且出峰时间和峰面积均相近, 但在波长为200 nm和210 nm时, 丙烯酰胺的峰有一定的拖尾现象。故选择205 nm作为丙烯酰胺的最佳检测波长 (色谱图略)。

2.2 样品提取方法的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

丙烯酰胺可不同程度的溶解于水、甲醇、乙醇和乙酸乙酯等多种溶剂,且在水中溶解度最大。而与水相比,高浓度的氯化钠溶液在提取丙烯酰胺的同时可使样品中的蛋白质发生盐析作用,从而有效抑制其乳化的过程,可进一步提高丙烯酰胺的回收率,故高浓度氯化钠溶液也是一种良好的丙烯酰胺提取溶剂。本研究分别选取2 mol/L氯化钠溶液和纯水作为提取溶剂,再分别配合磁力搅拌和超声振荡两种方式进行丙烯酰胺的提取。结果表明,采用超声振荡时,氯化钠溶液和纯水的丙烯酰胺回收率分别为90.0%和72.6%;采用磁力搅拌时,氯化钠溶液和纯水的丙烯酰胺回收率分别为95.9%和85.5%(表1)。可以看出,2 mol/L的氯化钠溶液作为提取溶剂,并结合磁力搅拌的方式进行样品中丙烯酰胺提取的效果最好。

表1 不同提取溶剂方法加标回收率测定结果 ($n=3$)

Table 1 Recovery rates of acrylamide with different eluents and methods ($n=3$)

提取溶剂	提取方法	加标前含量/ ($\mu\text{g/kg}$)	加标量/ ($\mu\text{g/kg}$)	测定量/ ($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%
氯化钠溶液 (2 mol/L)	超声振荡	106.3	100	185.6 ± 1.8	90.0 ± 2.5
	磁力搅拌	111.7	100	203.1 ± 8.3	95.9 ± 1.7
水	超声振荡	98.6	100	144.4 ± 9.0	72.6 ± 3.2
	磁力搅拌	90.4	100	163.5 ± 29.9	85.5 ± 2.1

2.2.2 脱脂溶剂的选择

油炸猪肉中大量油脂的存在会严重影响丙烯酰胺的提取纯化以及检测的过程,故需对样品进行脱脂处理。由于丙烯酰胺不溶于烷烃化合物,故本研究分别选取正己烷、环己烷、石油醚3种溶剂对样品进行脱脂,并比较脱脂过程中三者对丙烯酰胺回收率的影响。结果表明,正己烷、石油醚和环己烷进行样品脱脂后,丙烯酰胺的损失率分别为1.7%、2.3%和4.5%,这说明脱脂步骤不会对丙烯酰胺的提取造成很大影响(表2)。相比而言,正己烷作为脱脂溶剂时丙烯酰胺标准品溶液的损失率最小,故选择正己烷作为脱脂溶剂。

表2 不同脱脂剂损失率测定结果 ($n=3$)

Table 2 Loss rates of acrylamide with different degreasant ($n=3$)

脱脂溶剂	丙烯酰胺标准液质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	脱脂后丙烯酰胺标准液质量浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	丙烯酰胺损失率/%
正己烷	10	9.83 ± 0.1	1.7
石油醚	10	9.77 ± 0.1	2.3
环己烷	10	9.55 ± 0.2	4.5

2.2.3 乙酸乙酯萃取次数的选择

由图1可知,萃取1次时,丙烯酰胺回收率只有35%,萃取2次时回收率提高到55.3%,萃取3次时的回收率显著增加到84.6%。当继续增加萃取次数到4次和5次时,丙烯酰胺的回收率没有明显增长,说明萃取次数达到3次时,已可将丙烯酰胺充分萃取出来,故确定乙酸乙酯萃取次数为3次。

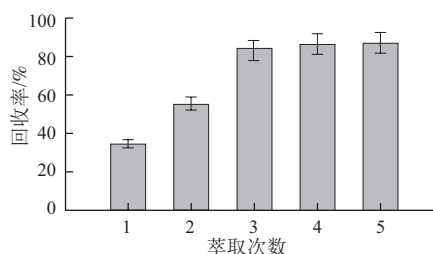


图1 乙酸乙酯液萃取次数对丙烯酰胺回收率的影响 ($n=3$)

Fig.1 Effect of number of extraction cycles with ethyl acetate on the recovery of acrylamide ($n=3$)

2.3 固相萃取条件的优化

2.3.1 洗脱剂的选择

固相萃取可有效提高丙烯酰胺的回收率并有效减少杂质^[25]。本研究选用HLB固相色谱柱对样品进行纯化处理,分别选用超纯水以及25%、50%、75%、100%的甲醇溶液作为洗脱液,并分别对质量浓度为0.05、0.25、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的丙烯酰胺标准品进行洗脱,比较丙烯酰胺的回收率。由图2可知,当选用纯水进行洗脱时,3种质量浓度的丙烯酰胺回收率分别为93.6%、87.3%、92.3%。随着甲醇比例的增加,丙烯酰胺的回收率均有所下降。当甲醇体积分数增长到75%时,已检测不到0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的丙烯酰胺。故本实验选择超纯水作为洗脱溶剂。

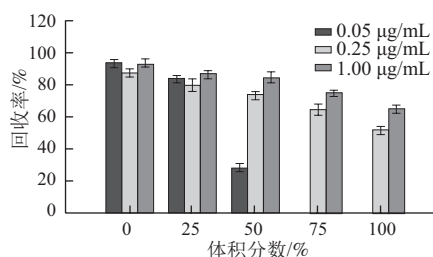


图2 不同体积分数甲醇溶液作为洗脱液时丙烯酰胺的固相萃取回收率 ($n=3$)

Fig.2 Effect of eluent (methanol) concentration on the recovery of acrylamide ($n=3$)

2.3.2 洗脱液体积的选择

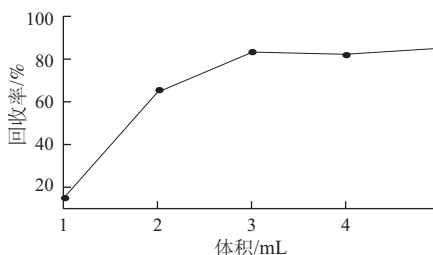


图3 丙烯酰胺淋洗曲线

Fig.3 Acrylamide elution curve with different eluent volumes

由图3可知,随着超纯水体积不断增加,丙烯酰胺的回收率逐渐升高。当超纯水体积达到3 mL时,丙烯酰胺

回收率达到83.5%。随后再增加洗脱剂体积, 丙烯酰胺回收率并没有明显增加, 由此说明用3 mL的水就可将丙烯酰胺基本洗脱出来, 再加大洗脱量并不能更大程度地提高回收率, 故从经济的角度讲, 选择3 mL为洗脱体积较合适。

2.4 方法评价

2.4.1 线性关系与最低检出限

丙烯酰胺在0.05~1.00 $\mu\text{g/mL}$ 之间, 峰面积和质量浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $y=0.9814x+0.2623$, 线性相关系数 R^2 为0.9998。以信噪比为3的条件下计算得出丙烯酰胺的最低检出限(定性检出限)为6 $\mu\text{g/kg}$, 以信噪比为10的条件下计算得出丙烯酰胺的定量检出限为20 $\mu\text{g/kg}$ 。丙烯酰胺标准品色谱图见图4。

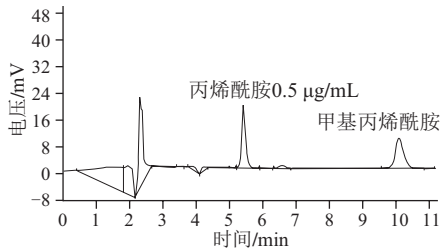


图4 丙烯酰胺标准品高效液相色谱图

Fig.4 HPLC Chromatogram of acrylamide standard

2.4.2 精密度与回收率

表3 高效液相色谱方法检测油炸猪肉中丙烯酰胺的加标回收率 ($n=5$)

Table 3 Recoveries of acrylamide spiked in deep-fried pork by the HPLC method ($n=5$)

加标前含量/ ($\mu\text{g/kg}$)	加标量/ ($\mu\text{g/kg}$)	测定量/ ($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	相对标准 偏差/%
108	50	142.5 ± 5.3	90.2 ± 2.4	2.7
108	100	187.5 ± 6.4	90.1 ± 3.0	3.3
108	200	282.0 ± 6.6	91.6 ± 2.2	2.4

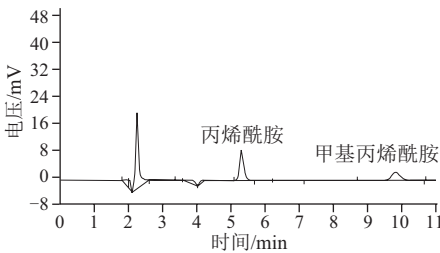


图5 实际样品高效液相色谱检测图

Fig.5 HPLC chromatogram of real sample

回收率可以反映出待测物质在样品分析处理过程中的损失程度, 回收率越高说明损失越少, 其方法的准确度也就越高。分别按照50、100、200 $\mu\text{g/kg}$ 的加标水平向样品中加入丙烯酰胺标准品, 计算平均回收率(表3)。结果表明, 丙烯酰胺的加标回收率在

90%~92%之间, 相对标准偏差小于3.5%, 说明本研究的样品准备方法和高效液相色谱检测方法可靠、精密度高。油炸猪肉中丙烯酰胺的加标前含量为108 $\mu\text{g/kg}$, 其检测色谱图见图5。

3 结论

本实验建立了油炸猪肉中丙烯酰胺的固相萃取-高效液相色谱检测方法。该方法通过正己烷脱去样品之中的脂类, 经过氯化钠溶液提取和乙酸乙酯萃取后, 采用固相萃取柱的固相萃取, 可较好地除去干扰杂质, 大大提高样品的净化程度, 该法定性检出限达6 $\mu\text{g/kg}$, 定量检出限为20 $\mu\text{g/kg}$, 回收率在90%~92%之间, 相对标准偏差小于3.5%。本方法操作简便、快速, 对所需液相色谱仪器要求较低, 可在大多数实验室中进行, 具有较好的推广价值。

参考文献:

- [1] ORACZ J, NEBESNY E, ZYZELEWICZ D. New trends in quantification of acrylamide in food products[J]. Talanta, 2011, 86(30): 23-34.
- [2] BENFORDA D, BOLGER P M, CARTHEW P, et al. Application of the margin of exposure approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic[J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(Suppl 1): 2-24.
- [3] BUSK L. Acrylamide: a case study on risk analysis[J]. Food Control, 2010, 21(12): 1677-1682.
- [4] SKOG K, VIKLUND G. Processing contaminants: acrylamide[J]. Encyclopedia of Food Safety, 2014, 2: 363-370.
- [5] FOOT R J, HAASE N U, GROB K, et al. Acrylamide in fried and roasted potato products: a review on progress in mitigation[J]. Food Additives and Contaminants, 2007, 24(Suppl 1): 37-46.
- [6] SKOG K, VIKLUND G. Processing contaminants: acrylamide[J]. Encyclopedia of Food Safety, 2014, 5: 363-370.
- [7] ROSEN J, HEILENAS K E. Analysis acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analyst, 2002, 127(7): 880-882.
- [8] VINCI R M, MESTDAGH F, MEULENAER B D. Acrylamide formation in fried potato products-present and future, a critical review on mitigation strategies[J]. Food Chemistry, 2012, 133(4): 1138-1154.
- [9] ZHANG Yu, XU Weizhong, WU Xiaoqin. Addition of antioxidant from bamboo leaves as an effective way to reduce the formation of acrylamide in fried chicken wings[J]. Food Additives and Contaminants, 2007, 24(3): 242-251.
- [10] BIEDERMANN M, GROB K. In GC-MS, acrylamide from heated foods may be coeluted with 3-hydroxy propionitrile[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(3): 945-948.
- [11] EEROLA U, HOLLEBEKKERS K, HALLIKAINEN A, et al. Acrylamide levels in Finnish foodstuffs analysed with liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2007, 51(2): 239-247.
- [12] SUN Shiyu, FANG Yun, XIA Yongmei. A facile of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC strategy[J]. Food Control, 2012, 26(2): 220-222.

- [13] WANG Haiyan, FENG Feng, GUO Yong, et al. HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2013, 31(1): 7-11.
- [14] MIZUKAMI Y, KOHATA K, YAMAGUCHI Y. Analysis of acrylamide in green tea by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7370-7377.
- [15] 程劼, 苏晓鸥, 张维. 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.
- [16] ZYZAK D V, SANDERS R A, STOJANOVI M, et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(16): 4782-4787.
- [17] RUFIAN-HENARES J A, MORALES F J. Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC-MS method based on a stable isotope dilution assay[J]. Food Chemistry, 2006, 97(3): 555-562.
- [18] PALEOLOGOS E K, KONTOMINAS M G. Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1007(2): 128-135.
- [19] JIANG Donglei, SUN Xiulan, ZHANG Yinzi. Preparation and application of acrylamide molecularly imprinted solid-phase extraction materials[J]. Analytical Methods, 2012, 4(11): 3760-3766.
- [20] 程雷, 郑炎夏, 徐虹, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定食品中的丙烯酰胺[J]. 食品科学, 2012, 33(2): 231-234.
- [21] TEKKELI S E, ONAL C, ONAL A. A review of current methods for the determination of acrylamide in food products[J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(1): 29-39.
- [22] MICHALAK J, GUJSKA E, KUNCEWICZ A. RP-HPLC-DAD studies on acrylamide in cereal-based baby foods[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2013, 32(1): 68-73.
- [23] 孙秀兰, 纪剑, 安璐, 等. 丙烯酰胺样品前处理及其检测方法研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(5): 456-459.
- [24] 廖燕芝, 黄辉, 杨代明, 等. GC-MS测定食品中丙烯酰胺含量的定量方法比较[J]. 食品与机械, 2013, 29(5): 91-94.
- [25] XIE Shanling, WANG Kai, ZHU Ruizhi, et al. Solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography for the determination of acrylamide in mainstream cigarette smoke[J]. Mendeleev Communication, 2009, 19(6): 344-345.