

# HPLC 同时测定烤肉中的 丙烯酰胺和杂环胺<sup>①</sup>

欧阳运富 唐宏兵 吴英 赵立凡 李贵英<sup>②</sup>

(常州市疾病预防控制中心 江苏省常州市新北区泰山路 203 号 213022)

**摘 要** 建立了高效液相色谱法同时测定烤肉中丙烯酰胺和杂环胺的新方法。选择适宜的样品前处理方法提取和净化样品, 经 TSK-gel ODS-80T M 柱分离并以配备二极管阵列和紫外检测器的 HPLC 对丙烯酰胺和杂环胺进行测定。结果表明, 该方法的线性范围为 0.02—32.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 检出限为 0.2—0.4  $\text{ng}/\text{g}$ ; 回收率为 67.3%—95.8%, 相对标准偏差为 1.62%—5.33%。该方法简便、快速, 准确度高, 易推广应用。

**关键词** 高效液相色谱法; 烧烤食品; 丙烯酰胺; 杂环胺

中图分类号: O657.7<sup>+</sup> 2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)05-2399-04

## 1 引言

上世纪 70 年代末, 人们发现含氮(主要是蛋白质)食物经高温加热后会产生致突变性和致癌性很强的杂环胺类(HAAs)物质, 现已从各种烹调食品中检出 20 多种此类物质<sup>[1]</sup>。2002 年 4 月, 瑞典国家食品管理局和斯得哥尔摩大学的研究人员首次报道在油炸、高温烘焙的淀粉类食品(如油炸薯片、烤面包等)中检测出高含量的丙烯酰胺(AA)<sup>[2]</sup>, 随后美国、英国、日本等相关的研究机构证实了该报道。由于丙烯酰胺和杂环胺对人类均具有潜在的致癌性, 而人们的日常食品经高温烹调后常常会同时产生这些有毒的化合物<sup>[3]</sup>, 也就意味着人们在持续不断的摄入这些有毒物质, 因此, 同时检测高温烹调食品中丙烯酰胺和杂环胺的含量具有重要意义。2-氨基-3-甲基咪唑[4, 5-f] 喹啉(IQ)、2-氨基-3, 8-二甲基咪唑[4, 5-f] 喹啉(MeIQ<sub>x</sub>) 和 2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑[4, 5-b] 嘧啶(PhIP) 是食品中最常见的三类杂环胺<sup>[4]</sup>, 它们与丙烯酰胺一样, 主要是食物中的已糖和氨基酸通过美拉德反应形成的<sup>[5, 6]</sup>, 且均被国际癌症研究协会(IARC)列为人类可疑或潜在致癌物(IQ 和 AA 列为 2A 类, MeIQ<sub>x</sub> 和 PhIP 列为 2B 类<sup>[7]</sup>)。迄今, 尚无同时检测上述 4 种化合物的相关报道, 本文首次采用高效液相色谱-紫外检测器法同时测定烤肉中的丙烯酰胺和杂环胺, 取得了满意的结果。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 配置四元泵、真空在线脱气机、自动进样器、二极管阵列检测器和双波长紫外检测器; AutoTrace 280 全自动固相萃取仪(美国戴安公司); SK 3300LHC 超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司); AG 245 万分之一电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); ETS-2 高速匀浆机(江苏金坛市亿通电子有限公司); Delta 320 型 pH 计(瑞

① 常州市自然科学基金资助(CS2008209)

② 联系人, 电话: (0519) 86681625; 手机: (0) 18015010917; E-mail: liguiying123@163.com

作者简介: 欧阳运富(1971—), 男, 湖南省宁远县人, 副主任技师, 硕士, 主要从事环境毒物检测方法及分子机理的研究工作。

收稿日期: 2011-04-16; 接受日期: 2011-05-09

士梅特勒-托利多公司); 85-2 型磁力搅拌器(江苏金坛市恒丰仪器厂); Extrelut-20NT 液液萃取柱(美国 Welch Materials 公司); P-SCX 固相萃取小柱(60mg/3mL, 美国 Welch Materials 公司)。

AA、IQ、MeIQx、PhIP 标准品(纯度均为 99.5%)均购自加拿大 Toronto 公司; 甲醇、乙腈、二氯甲烷均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

## 2.2 色谱条件

色谱柱为 TSK-gel ODS-80T<sub>M</sub> (25cm × 4.6mm, 5μm, 日本 Tosoh 公司); 流动相: 乙腈和 0.01mol/L 三乙胺(用 0.1mol · L<sup>-1</sup> 磷酸调 pH3.2), 其梯度洗脱程序如下: 0min, 5% 乙腈: 95% 三乙胺; 2min, 25% 乙腈: 75% 三乙胺; 8min, 45% 乙腈: 55% 三乙胺; 14.01—15min, 5% 乙腈: 95% 三乙胺。检测波长: 210nm; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20μL。

## 3 结果与讨论

### 3.1 检测波长的选择

用二极管阵列检测器在 190—400nm 范围内对各组分分别进行全扫描, 其紫外光谱图见图 1。由图 1 可见, AA、IQ、MeIQx 及 PhIP 4 种物质在 200—220nm 波长范围内均有较强吸收峰, 综合考虑杂质干扰、检测灵敏度等因素确定检测波长为 210nm。

### 3.2 流动相的选择

分别试验了甲醇-乙酸钠、乙腈-乙酸钠、乙腈-三乙胺等多种流动相, 结果表明: 用乙腈-三乙胺(用磷酸调 pH) 溶液进行梯度洗脱, 各组分分离效果较好, 且灵敏度较高。

### 3.3 校准曲线、线性关系与检出限

用甲醇配制浓度分别为 0.05、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0μg/mL 的混合标准溶液, 在确定的色谱条件下进样, 以峰面积  $y$  (mAU) 对浓度  $C$  (μg/mL) 进行线性回归, 得各组分的线性回归方程、线性范围、相关系数, 并依据信噪比  $S/N = 3$  测得各组分的检出限, 结果见表 1。

表 1 线性回归方程与相关系数

化合物	保留时间 (min)	线性回归方程	线性范围 (μg/mL)	相关系数	检出限 (ng/g)
AA	4.496	$y = 117501C - 11966$	0.03—24.0	0.9991	0.3
IQ	8.623	$y = 265107C - 388.3$	0.02—32.0	0.9998	0.2
MeIQx	10.298	$y = 207980C - 3422.9$	0.02—32.0	0.9997	0.2
PhIP	13.630	$y = 113267C - 39798$	0.04—24.0	0.9990	0.4

### 3.4 方法的回收率、精密度

准确称取同一烧烤肉样 3 份, 每份 4g, 其中 2 份分别加入浓度为 10μg/mL 的混合标准溶液 5、20μL, 添加水平分别为 12.5、50.0ng/g, 另 1 份不加, 然后进行样品处理和高效液相色谱分析 ( $n = 6$ ), 计算回收率和精密度, 结果见表 2。由表 2 可见, 各组分的回收率在 67.3%—95.8%, 相对标准偏差在 1.62%—5.33%。各组分的回收率不同, 主要是由于 P-SCX 柱对各组分的选择性吸附不同所致。

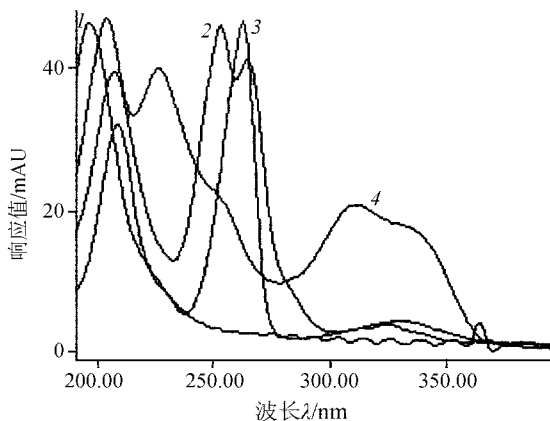


图 1 紫外光谱图

1—AA; 2—IQ; 3—MeIQx; 4—PhIP。

表 2 方法的回收率和精密度

(n=6)

化合物	添加水平 (ng/g)			
	12.5		50	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
AA	94.4	1.92	95.8	1.62
IQ	92.7	3.25	93.6	2.81
MeIQx	89.3	3.87	91.5	4.05
PhIP	71.2	5.33	67.3	5.17

### 3.5 样品处理及测定

自某超市购买肉样 5 份, 经炭烤 10min 后按下述方法处理: 称取碾细混匀的烤肉 4g 与 12mL 1mol/L NaOH 混合, 置于磁力搅拌器上搅拌 1h, 加入 12g 硅藻土并混匀后填充入 Extrelut-20 NT 空柱中, 用 50mL 正己烷淋洗脱油脂, 弃去淋洗液, 再用 60 mL 二氯甲烷将杂环胺从 Extrelut-20NT 柱中洗脱, 洗脱液通过 P-SCX 固相萃取小柱用全自动固相萃取仪萃取, 并用 5mL 甲醇: 氨水 (28%) 混合溶液 (体积比为 19: 1) 洗脱至浓缩管中。将最后的洗脱液在 40℃ 经氮气吹干, 再用甲醇定容至 1mL, 过 0.45μm 滤膜后吸取 20μL 注入 HPLC 分析, 以校准曲线法分别测定样本中 AA、IQ、MeIQx、PhIP 的含量, 每个样本平行测定两次。混合标准及样品色谱图见图 2。

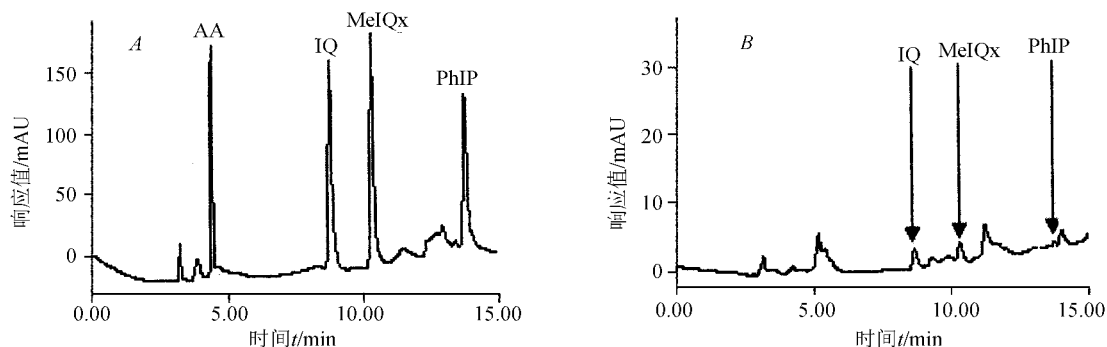


图 2 混合标准(A)及样品(B)色谱图

由表 3 可知, 在 5 种传统烤肉中均检测出 PhIP 含量在 0.8—4.1ng/g。在烤鸡肉和烤猪肉中均检出 AA 和 3 种杂环胺, 烤牛肉和烤鱼肉中均只检出 AA 和 PhIP, 而烤羊肉中仅检出了微量的 3 种杂环胺。出现上述结果可能与各类肉样中所含氨基酸种类及含量不同有关。

表 3 样品测定结果

(n=2)

样品名称	AA (ng/g)	IQ (ng/g)	MeIQx (ng/g)	PhIP (ng/g)
烤鸡肉	10.6	0.92	1.3	3.2
烤羊肉	—	1.9	1.6	0.8
烤牛肉	3.7	—	—	4.1
烤猪肉	6.6	0.57	1.3	2.5
烤鱼肉	4.5	—	—	1.3

注: 表中“—”代表未检出。

## 4 结论

本文采用高效液相色谱-紫外检测器法同时测定烤肉中的丙烯酰胺和杂环胺, 操作简便、快速、准确、灵敏, 易推广应用。

## 参考文献

- [1] Oz F. Quantitation of Heterocyclic Aromatic Amines in Ready to Eat Meatballs by Ultra Fast Liquid Chromatography [J]. *Food Chemistry*, 2011, **126**: 2010—2016.
- [2] Geng Z M, Jiāng R, Chen M. Determination of Acrylamide in Starch-Based Foods by Ion-Exclusion Liquid Chromatography [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, **21**: 178—182.
- [3] Alaejos M S, Ayala J H, González V *et al.* Analytical Methods Applied to the Determination of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods [J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, **862**: 15—42.
- [4] Durling L J K, Abramsson-Zetterberg L. A Comparison of Genotoxicity Between Three Common Heterocyclic Amines and Acrylamide [J]. *Mutation Research*, 2005, **580**: 103—110.
- [5] Janoszka B, Blaszczyk U, Damasiewicz-Bodzek A *et al.* Analysis of Heterocyclic Amines (HAs) in Pan-Fried Pork Meat and Its Gravy by Liquid Chromatography with Diode Array Detection [J]. *Food Chemistry*, 2009, **113**: 1188—1196.
- [6] Stadler R H, Blank I, Varga N *et al.* Acrylamide from Maillard Reaction Products [J]. *Nature*, 2002, **419**: 449—450.
- [7] Liao G Z, Wang G Y, Xu X L *et al.* Effect of Cooking Methods on the Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Chicken and Duck Breast [J]. *Meat Science*, 2010, **85**: 149—154.

## Simultaneous Determination of Acrylamide and Heterocyclic Amines in Roast Meat by HPLC

OUYANG Yun-Fu TANG Hong-Bing WU Ying ZHAO Li-Fan LI Gui-Ying  
(Changzhou Center for Disease Control and Prevention, Changzhou, Jiangsu 213022, P.R. China)

**Abstract** A novel method for the simultaneous determination of acrylamide (AA) and heterocyclic amines (HAAs) in roast meat was established by high performance liquid chromatography (HPLC). After the sample was extracted and purified by the suitable pretreatment method, AA and HAAs were separated by TSK-gel ODS-80TM column and determined by HPLC system with diode array detector (DAD) and ultraviolet detector. The linear range was between 0.02—32.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and the detection limit was 0.2—0.4  $\text{ng}/\text{g}$ , and the recoveries were in the range of 67.3%—95.8%, while RSD was from 1.62%—5.33%. The method is simple and rapid with a good accuracy, which can be easily popularized to application.

**Key words** HPLC; Roast Meat; Acrylamide; Heterocyclic Amine

### 招聘启事

## 本刊招聘“沉潜专注 甘于寂寞”的编辑 1 名

因工作需要,本刊招聘编辑 1 名,条件如下:

1. 大学化学或物理学本科(包括同等学力、博士、硕士等)毕业,成绩良好;
2. 身体健康,不吸烟,对人诚实、守信、和善;
3. 工作认真负责,任劳任怨,勤奋节俭,热爱科学,沉潜专注,甘于寂寞;
4. 不限户口,性别,年龄,民族,党派,信仰等。

免费提供在北京市住宿,工资 3000—5000 元/月,上保险。有意者,请将本人简历发至《光谱实验室》编辑部电子邮箱: gpsys@periodicals.net.cn。

光谱实验室编辑部