

## Applying Different Chromatographic Columns for Acrylamide Analysis in Potato Chips by High-Performance Liquid Chromatography

BABAK SAMANIPOUR<sup>1</sup>, MARYAM JALILI<sup>2\*</sup>, KARAMATOLLAH REZAEI<sup>3</sup>, FATANEH SHOKROLAHI<sup>4</sup>

1. PhD Student, Faculty of Food Industries and Agriculture, Standard Research Institute-ISIRI, Karaj, Iran
  2. Assistant Professor, Faculty of Food Industries and Agriculture, Standard Research Institute-ISIRI, Karaj, Iran
  3. Professor, Department of Food Science, Engineering, and Technology, University of Tehran, Karaj, Iran
  4. MS Graduated, Faculty of Food Industries and Agriculture, Standard Research Institute-ISIRI, Karaj, Iran
- (Received: July. 9, 2018- Revised: Sep. 14, 2018- Accepted: Oct. 10, 2018)

### ABSTRACT

Acrylamide is a toxic compound produced in some processed foods. The purpose of this research was to provide an easy and reliable method for measuring acrylamide in potato chips by HPLC-PDA. For this purpose, the effect of 5 columns ODS-H-C18 Optimal, Sphere-Image 80-5 ODS 2, Zorbax Hilic Plus, Lichrosorb-100 NH2 and Shodex NH2P-50 4E were investigated on the separation and measurement of acrylamide in chips. The best results were obtained with the use of the new generation of Shodex NH2P-50 4E amino columns, and acrylamide peak was isolated successfully without the need for solid state purification steps. The standard calibration curve was linear in the range of 100-5000  $\mu\text{g} / \text{L}$  ( $R^2 = 0.997$ ). Recycling percentages in the range of 95.9% to 102.2%, the detection limit and the limit of value were 9 and 27  $\mu\text{g} / \text{Kg}$  respectively. The repeatability of this method was appropriate and the relative standard deviation was 4.39%.

**Keywords:** Acrylamide, Analysis, Chromatography Column, Liquid Chromatography, Photodiode Array Detector.

## مقایسه کاربرد ستون‌های مختلف برای آنالیز آکریلامید در چیپس سیب زمینی با روش کروماتوگرافی مایع

بابک سامانی‌پور<sup>۱</sup>، مریم جلیلی<sup>۲\*</sup>، کرامت اله رضایی<sup>۳</sup>، فتانه شکرالهی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

۲. استادیار، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

۳. استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. دانش آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۸ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۶/۲۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۷/۱۸)

### چکیده

آکریلامید ترکیبی است سمی که در برخی از مواد غذایی فرآیند شده ایجاد می‌شود. هدف از این پژوهش، ارائه یک روش آسان و قابل اطمینان برای اندازه‌گیری آکریلامید در چیپس سیب زمینی بود. بدین منظور، اثر ۵ ستون ODS-H-C18، Shodex NH2P-50 و Lichrosorb-100 NH2، Zorbax Hilic Plus، Sphere-Image 80-5 ODS 2، Optimal 4E بر جداسازی و اندازه‌گیری آکریلامید در چیپس بررسی گردید. بهترین نتایج با کاربرد ستون آمینه نسل جدید Shodex NH2P-50 4E، به دست آمد و پیک آکریلامید با موفقیت و بدون نیاز به انجام مراحل پاکسازی با فاز جامد جداسازی شد. منحنی کالیبراسیون استاندارد در محدوده ۱۰۰-۵۰۰۰  $\mu\text{g/L}$  کاملاً خطی بود ( $R^2=0/997$ ). درصد بازیافت در محدوده ۹۵/۹٪ تا ۱۰۲/۲٪، حد شناسایی و حد تعیین مقدار کمی نیز به ترتیب  $9 \mu\text{g/kg}$  و  $27 \mu\text{g/kg}$  به دست آمد. تکرار پذیری این روش مناسب بوده و شاخص انحراف استاندارد نسبی برابر ۴/۳۹٪ بود.

**واژه‌های کلیدی:** آکریلامید، روش اندازه‌گیری، ستون کروماتوگرافی، کروماتوگرافی مایع، طیف سنجی نوری دیودی

### مقدمه

آکریلامید یک ترکیب بسیار قطبی با وزن مولکولی پایین می‌باشد که در مواد غذایی اسپایک از کربوهیدرات و دارای سطح متوسطی از پروتئین، در طی فرآیندهای حرارتی با دمای بالاتر از ۱۲۰ درجه سلسیوس تشکیل می‌گردد (Bent et al., 2012; Lee et al., 2007). این ماده دارای خاصیت نوروکسینی، ژنوتوکسینی بوده (Xu et al., 2013; Zhang et al., 2007) و همچنین سبب بروز سرطان در پستانداران می‌گردد به طوری که در سال ۱۹۹۴ آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان آکریلامید را در گروه 2A، به عنوان ترکیب محتمل سرطان‌زای انسانی، قرار داد (Mastovska & Lehotay, 2006; Wang et al., 2013). در سال ۲۰۰۲ تحقیقات اداره ملی غذای سوئد و دانشگاه استکهلم برای نخستین بار نشان داد که آکریلامید در یک سری از مواد غذایی سرخ شده یا پخته شده پرمصرف مانند چیپس سیب‌زمینی، سیب‌زمینی سرخ شده، غلات صبحانه، نودل و فرآورده‌های نانوائی به مقدار زیادی تشکیل می‌گردد (Fernandes & Soares, 2007; Paleologos & Kontominas, 2005). واکنش میلارد، به ویژه بین اسید آمینه آسپاراژین و

گلوکز (و یا سایر قندهای احیاءکننده) و در حضور حرارت، مهمترین مکانیسمی است که در طی آن آکریلامید تشکیل می‌گردد (Bent et al., 2012; Zhang et al., 2006). با توجه به اثرات سوء این ترکیب بر سلامت انسان، در سال ۲۰۰۹ اداره ایمنی غذای اتحادیه اروپا حداکثر مقدار این سم در فرآورده‌های سیب‌زمینی سرخ شده و انواع بیسکوئیت را به ترتیب ۲۶۶۸ و ۴۲۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم محصول اعلام نمود (EFSA, 2009).

با توجه به اهمیت این ماده در مواد غذایی، محققان روشهایی را برای اندازه‌گیری و تعیین مقدار کمی آن پیشنهاد نموده‌اند که اصلی‌ترین و متداول‌ترین آنها روش‌های کروماتوگرافی گازی و مایع است (Ghasemian et al., 2014; Mousavinejad et al., 2015; Sun et al., 2012). از میان سایر روش‌های آنالیز کمی آکریلامید در مواد غذایی می‌توان به روش الکتروفورز ناحیه موئینه و روش بیوسنسور ولتامتریک اشاره کرد (Bermudo et al., 2007; Bermudo et al., 2006a; Stobiecka et al., 2007; Tezcan & Bedia-Erim, 2008).

هریک از روش‌های کروماتوگرافی دارای مزایا و معایبی است. به عنوان مثال مزیت عمده روش کروماتوگرافی گازی، عدم نیاز نسبی به مراحل پاکسازی با فاز جامد (Fernandes &

آلدریچ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و کلیه حلال‌های شیمیایی نظیر متانول، استونیتریل، اسید استیک و آب دیونیزه از نوع مخصوص کروماتوگرافی مایع از شرکت دیجونگ کیمیکال (Daejung Chemicals and Metals, Gyongyi-) (do, Korea) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز شامل پتاسیم هگزا سیانو فرات تری هیدرات، سولفات روی هپتا هیدرات و  $n$ - هگزان از نوع آزمایشگاهی از شرکت مرک (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) تهیه شد. فالكون های پلی پروپیلن ۲۵ و ۵۰ میلی لیتر مخصوص سانتیفریوژ از شرکت ایزو لب (Iso LAB-Laborgerate, Wertheim, Germany)، فیلترهای سرسرنگی استات سلولز ۰/۲۲ میکرومتر از شرکت سی ان دلبیو (CNW Technologies, Dusseldorf, Germany) و ویال های شیشه‌ای با درب پیچی از شرکت آجیلنت (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) خریداری گردید.

#### محلول‌های استاندارد کاری و معرف‌ها

محلول مادر آکریلامید با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از حل کردن ۱۰۰ میلی‌گرم آکریلامید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ساخته شد. سپس محلولهای استاندارد آکریلامید (۱۰۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر لیتر آب) با رقیق سازی محلول مادر با آب دیونیزه تهیه شد. محلول مادر و محلولهای استاندارد آکریلامید پس از تهیه در داخل ویال های شیشه‌ای کهربایی و در دمای ۴ درجه سلسیوس در داخل یخچال تا زمان آنالیز نگهداری شدند. محلول کارز ۱ (carrez I) از حل کردن ۷/۵ گرم پتاسیم هگزا سیانو فرات تری هیدرات در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و محلول کارز ۲ (carrez II) از حل کردن ۱۵ گرم سولفات روی هپتا هیدرات در ۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه ساخته شد.

#### آماده‌سازی نمونه

کلیه نمونه‌های چیپس سیب زمینی از معروف‌ترین برندهای تجاری موجود در بازار خرده‌فروشی تهران تهیه گردید. مراحل کلی استخراج آکریلامید و آماده‌سازی نمونه بر حسب روش توصیف شده توسط گوکمن و همکاران انجام پذیرفت (Gokmen et al., 2005). ابتدا نمونه چیپس سیب‌زمینی به کمک میکسر (Moulinex, Ecully, France) کاملاً آسیاب شد. سپس، در داخل یک لوله سانتیفریوژ مقدار ۲ گرم از نمونه چیپس آسیاب شده ریخته و مقدار مشخصی از محلول استاندارد آکریلامید با غلظت معین به آن اسپایک شد. آنگاه مقدار ۱۰ میلی‌لیتر متانول به عنوان حلال آلی اولیه به لوله سانتیفریوژ اضافه کرده و سپس ۳ دقیقه کاملاً مخلوط و پس از آن تحت اثر

بالای نتایج است (Zhang et al., 2006; Zhu et al., 2008). ولی از سوی دیگر، لزوم مشتق سازی با برومیناسیون که با هدف افزایش وزن مولکولی و کاهش قطبیت آکریلامید انجام می‌شود، سبب پیچیدگی و طولانی شدن روش کروماتوگرافی گازی می‌گردد (Bent et al., 2012; Zhang et al., 2007). در مقابل، در روش کروماتوگرافی مایع نیازی به مشتق سازی با برومیناسیون نیست و همین موضوع سبب سادگی و کاهش زمان آزمون می‌شود (Geng et al., 2008; Rufian & Morales, 2006). اما از طرف دیگر، استفاده از آب دیونیزه به عنوان حلال استخراجی سبب استخراج سایر ترکیبات محلول در آب نیز می‌گردد. لذا، مشکل مداخله پیک‌های مربوط به سایر مواد موجود در ماتریکس نمونه ایجاد می‌شود. بنابر این، برای جلوگیری از بروز پیک های مزاحم و مداخله سایر مواد، در روش کروماتوگرافی مایع غالباً از یک مرحله پاکسازی با کارتریج فاز جامد استفاده می‌شود که خود منجر به پیچیدگی بیشتر و زمان بر بودن روش آزمون می‌گردد (Geng et al., 2008; Wang et al., 2013). لازم به ذکر است در برخی موارد از کاربرد یک یا دو آشکارگر طیف سنجی جرمی پشت سر هم استفاده می‌شود (Mastovska & Lehotay, 2006; Bermudo et al., 2006b). آشکارگر طیف سنجی جرمی علی‌رغم دقت و حساسیت بالای نتایج، بسیار پیچیده و گران قیمت بوده که این امر علاوه بر سختی آزمون، سبب افزایش هزینه این روش‌ها نیز می‌گردد. این در حالی است که یکی از ویژگیهای مهم یک روش آزمون، توجیه پذیر بودن آن از نظر اقتصادی است. همچنین عدم در دسترس بودن این آشکارگر در بسیاری از مجموعه‌های آزمایشگاهی داخل کشور، لزوم استفاده از سایر آشکارگرها را آشکار نمود (Wang et al., 2013; Zhu et al., 2008). به همین دلیل با توجه به اهمیت ویژه نوع ستون کروماتوگرافی نسبت به سایر متغیرهای آنالیز، هدف از این پژوهش، بررسی اثر نوع ستون کروماتوگرافی در هنگام استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و آشکارگر طیف سنجی نوری با آرایش دیودی (-HPLC PDA) جهت تعیین یک روش آسان، کم هزینه و قابل اطمینان برای اندازه‌گیری آکریلامید در چیپس سیب زمینی است. لذا در این پژوهش از انواع ستون‌های کروماتوگرافی غیر قطبی، آبدوست، آمینه سنتی بر پایه سیلیکا، و آمینه نسل جدید بر پایه ژل پلیمری آبدوست استفاده شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد و محلول‌های شیمیایی

آکریلامید ۹۹٪ از نوع مخصوص الکتروفورز از شرکت سیگما

تجهیزات جانبی نظیر پمپ مضاعف، سیستم هواگیری تحت خلاء، نمونه گذار اتوماتیک، آون ستون و آشکارگر بود. آشکارگر به کار رفته از نوع طیف سنجی نوری با آرایش دیودی (PDA) Waters 996 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) model photodiode array detector کاربرد آشکارگر PDA در این پژوهش به دلیل در دسترس بودن آن در مجموعه آزمایشگاهی ما بوده است. در این بررسی از میان متغیرهای آنالیز که بر نتیجه آزمون موثرند، تمرکز اصلی بر روی تاثیر نوع ستون کروماتوگرافی قرار گرفت. به این ترتیب از میان ستون‌های موجود در آزمایشگاه، پنج مورد با در نظر گرفتن قطبیت مواد پرکننده آنها و نوع برهمکنش با ترکیبات آبدوست، جهت بررسی امکان جداسازی آکرلامید انتخاب گردید (جدول شماره ۱).

دمای ستون های کروماتوگرافی ۲۵ درجه سلسیوس بود. شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده برای هر ستون از نظر نوع و نسبت ترکیبات فاز متحرک و طول موج شناسایی آکرلامید در جدول شماره ۲ مشخص گردیده است. در انتخاب ترکیبات فاز متحرک، از حلال‌هایی استفاده گردید که قابلیت سازگاری با ستون‌های کروماتوگرافی فوق را داشتند. همچنین از شدت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید.

امواج فراصوت به مدت ۸ دقیقه قرار گرفت و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه شیکر (Kunshan, China) محکم تکان داده شد. آنگاه محلول به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید. مقدار ۶ میلی‌لیتر از لایه شفاف فوقانی با میکروپیپت کشیده و جهت رسوب پروتئین‌ها مقدار ۲۴۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های کارز ۱ و ۲ در آن ریخته و مجدداً سانتریفوژ شد. به منظور انجام مرحله پیش تغلیظ، مقدار ۵ میلی‌لیتر از لایه شفاف فوقانی را برداشته و در بن ماری ۶۰ درجه سلسیوس مجهز به جریان گاز نیتروژن به مدت ۱ ساعت قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. آنگاه مقدار ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۱ میلی‌لیتر هگزان نرمال اضافه و به مدت ۳ دقیقه تکان داده شد. سپس، با استفاده از سرنگ فیلتردار ۰/۲۲ میکرومتر، فیلتراسیون نهایی انجام پذیرفت. آنگاه مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از محلول شفاف فیلترشده کشیده و در داخل ویال شیشه ای جمع آوری گردید و نمونه آماده تزریق به کروماتوگرافی مایع گردید.

#### آنالیز نمونه با دستگاه HPLC – PDA

برای تعیین مقدار کمی آکرلامید از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters 717 model HPLC system Waters Corporation, Milford, MA, USA) استفاده شد که دارای

جدول ۱. مشخصات فنی ستون‌های کروماتوگرافی مورد استفاده جهت جداسازی آکرلامید با استفاده از روش HPLC-PDA

ردیف	نام ستون کروماتوگرافی	نوع ستون	ابعاد	شرکت سازنده
۱	ODS-H-C18 Optimal	غیر قطبی	250×4.5 mm, 5µm	Capital HPLC (Scotland, UK.)
۲	Sphere-Image 80-5 ODS 2	غیر قطبی	250×4 mm, 5µm	Herbert Kenauer (Berlin, Germany)
۳	Zorbax Hilic Plus	آبدوست	50×4.6 mm, 3.5µm	Agilent Technologies (Wil., USA)
۴	Lichrosorb-100 NH2	آمینه بر پایه سیلیکا	250×4 mm, 5µm	Herbert Kenauer (Berlin, Germany)
۵	Shodex Asahipak NH2P-50 4E	آمینه بر پایه پلی وینیل الکل	250×4.6mm, 5µm	Shodex Group (Kawasaki, Japan)

جدول ۲. شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده برای ستون‌های کروماتوگرافی به کار رفته جهت اندازه‌گیری آکرلامید در چپیس سبب زمینی با استفاده از روش

#### HPLC-PDA

ردیف	ستون کروماتوگرافی	ترکیب فاز متحرک	طول موج شناسایی (nm)
۱	ODS-H-C18 Optimal	۳٪ اسید استیک - ۵ mM - ۹۷٪ استونیتریل	۲۱۰/۲۲۶*
		۹۰٪ اسید استیک - ۵ mM - ۱۰٪ استونیتریل	۲۱۰
		۱۰۰٪ آب دیونیزه	۲۰۰
۲	Sphere-Image 80-5 ODS 2	۸۶/۵٪ آب دیونیزه - ۱۳/۵٪ استونیتریل	۲۰۰
		۹۰٪ آب دیونیزه - ۱۰٪ استونیتریل	۲۰۰
۳	Zorbax Hilic Plus	۱۰۰٪ آب دیونیزه	۲۰۰/۲۱۰/۲۲۶*
۴	Lichrosorb-100 NH2	۹۴/۴٪ آب دیونیزه - ۵/۶٪ استونیتریل	۲۰۰
۵	Shodex Asahipak NH2P-50 4E	۹۴/۴٪ آب دیونیزه - ۵/۶٪ استونیتریل	۲۰۰

\*: با توجه به وجود پیوند دوگانه در ساختار شیمیایی مولکول آکرلامید، طول موج ۲۲۶ نانومتر به عنوان یکی از طول موجها، مورد استفاده قرار گرفت.

۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی و در هر سطح با دوبار تکرار (n=۲) اسپایک شدند. سپس نمونه‌های اسپایک شده استخراج و به دستگاه کروماتوگرافی تزریق و منحنی کالیبراسیون در محدوده ۲۵۰-۵۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی ترسیم گردید. آنگاه با توجه به فرمول‌های زیر حد شناسایی و حد تعیین مقدار کمی تعیین شد.

$$\text{LOD} = 3.3 \times (s/S) \quad (\text{رابطه ۱})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (s/S) \quad (\text{رابطه ۲})$$

به طوری که در این روابط، s انحراف استاندارد عرض از مبدا و S شیب منحنی کالیبراسیون می‌باشند (Fernandes & Soares, 2007; Lee et al., 2013).

### نتایج و بحث

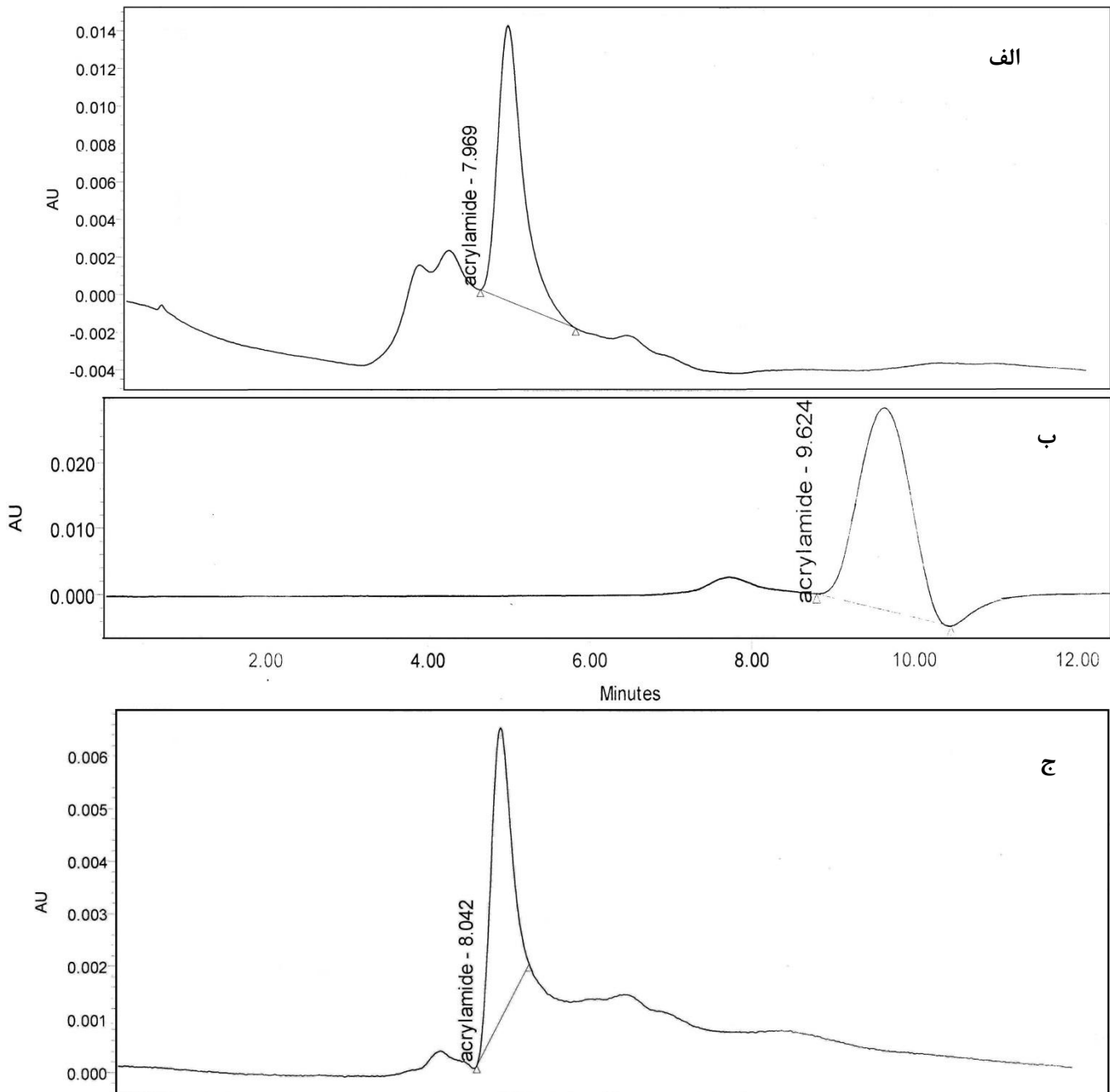
اثر شرایط مختلف آزمایش با استفاده از ستون ODS-H-C18 Optimal جهت اندازه‌گیری آکریلامید

برای این منظور ابتدا از مخلوط دو حلال اسید استیک ۵ میلی‌مولار و استونیتریل در نسبت ۳٪ به ۹۷٪ (حجمی-حجمی) به عنوان فاز متحرک و طول موج ۲۱۰ نانومتر جهت شناسایی پیک آکریلامید استفاده شد. در این حالت پیک آکریلامید در دقیقه ۷/۹۶ جداسازی گردید (شکل ۱-الف). اما شکل پیک آکریلامید نامناسب و با فاصله از خط پایه بود و با دو پیک مجاور خود دارای هم پوشانی بود که حکایت از غیر انتخابی بودن و وجود مزاحمت در این روش داشت. در ادامه و به منظور حذف مداخله پیک‌های مزاحم و بهبود شکل پیک آکریلامید حاصل شده، با حفظ ترکیب فاز متحرک از طول موج ۲۲۶ نانومتر جهت شناسایی استفاده گردید. این امر نیز سبب حذف پیک‌های مزاحم نشد و پیک آکریلامید که در دقیقه ۸/۰ جداسازی گردیده بود همچنان دارای شکل و فاصله نامناسب تا خط پایه بود (شکل ۱-ب). در گام بعدی به منظور اصلاح شکل پیک آکریلامید، میزان قطبیت فاز متحرک افزایش یافت و به این ترتیب از مخلوط دو حلال اسید استیک ۵ میلی‌مولار و استونیتریل در نسبت ۹۰٪ به ۱۰٪ (حجمی-حجمی) به عنوان فاز متحرک بهره گرفته شد (شاخص قطبیت آب ۹، شاخص قطبیت اسید استیک ۶/۲، شاخص قطبیت استونیتریل ۵/۸). همچنین به طور همزمان طول موج شناسایی نیز تغییر کرد و آنالیز در طول موج ۲۱۰ نانومتر صورت گرفت. پس از تزریق محلول‌های استاندارد، پیک آکریلامید در دقیقه ۹/۶ ظاهر شد که دارای شکلی پهن و نامناسب بود (شکل ۱-ج).

جهت اجرای مراحل آزمون ابتدا محلول‌های استاندارد آکریلامید ساخته شده و سپس با کاربرد هر یک از پنج ستون کروماتوگرافی و شرایط آزمایشگاهی مربوط به آنها (جدول ۲)، به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شدند. سپس اثر نوع ستون کروماتوگرافی بر روی شکل و خصوصیات ظاهری پیک آکریلامید حاصل شده بررسی گردید. در صورت عدم دستیابی به شکل پیک مناسب در مورد محلول‌های استاندارد آکریلامید بررسی روش بعدی در دستور کار قرار گرفته و در صورت دستیابی به شکل پیک مناسب، روش با استفاده از نمونه حقیقی بررسی شد. به این نحو که نمونه‌های چیپس سیب زمینی با استفاده از محلول استاندارد آکریلامید اسپایک شده و بعد مراحل استخراج آکریلامید از نمونه‌های چیپس سیب زمینی با استفاده از روش استخراج با متانول انجام پذیرفت. آنگاه محلول‌های آکریلامید استخراج شده به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق و درصد بازیافت روش آزمون محاسبه شد.

### اعتبار بخشی آزمون (Method Validation)

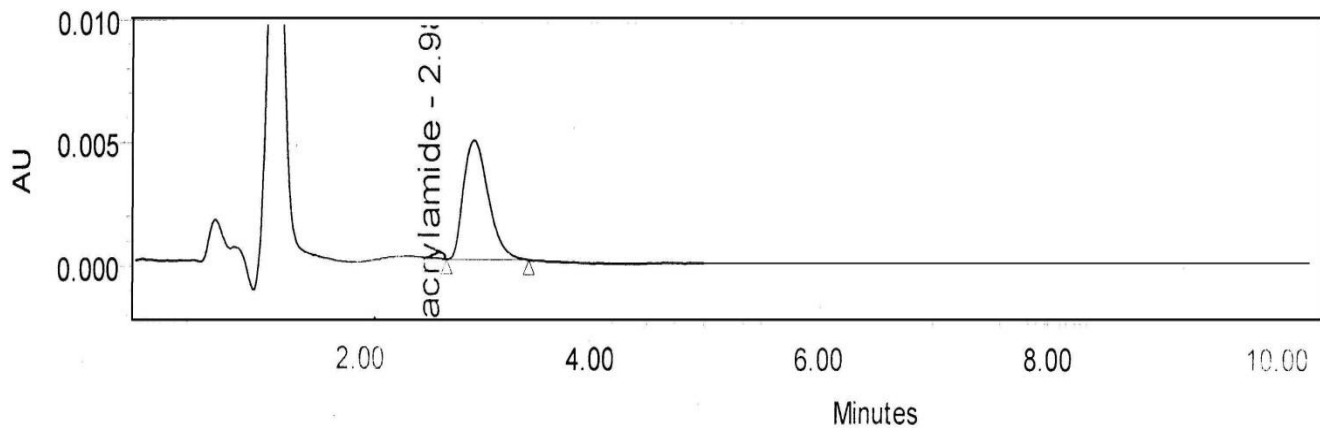
برای اعتبار بخشی روش از آکریلامید به عنوان استاندارد خارجی استفاده شد. یک منحنی کالیبراسیون ۵ نقطه‌ای در محدوده غلظت ۵۰۰-۱۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر لیتر آب با استفاده از سطح زیر پیک ترسیم و سپس معادله رگرسیون (y = ax + b) در محدوده خطی منحنی کالیبراسیون، با استفاده از نرم افزار Excel 2010 software (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) محاسبه شد. از این منحنی در تعیین مقدار کمی آکریلامید در نمونه‌های چیپس سیب‌زمینی استفاده شد. پس از کاربرد هر یک از ستون‌های پنجگانه (جدول ۱)، در صورتیکه شکل و خصوصیات ظاهری پیک محلول استاندارد آنها مناسب بوده و منحنی کالیبراسیون آنها با موفقیت رسم شده بود درصد بازیافت محاسبه شد. به منظور تعیین درصد بازیافت، نمونه‌های چیپس سیب زمینی با استفاده از غلظت مشخصی از محلول استاندارد آکریلامید در ۳ سطح ۵۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی اسپایک شدند (n=۲). سپس غلظت نهایی با در نظر گرفتن فاکتور پیش تغلیظ و غلظت آکریلامید در نمونه شاهد، محاسبه شد. به منظور بررسی تکرار پذیری روش، نمونه‌های چیپس سیب زمینی در مدت ۳۰ روز و با فواصل زمانی ۶ روزه (n=۵) در سطح غلظت ۱۲۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی اسپایک و شاخص انحراف استاندارد نسبی (RSD) تعیین شد. به منظور تعیین حد شناسایی (LOD) و حد تعیین مقدار کمی (LOQ)، نمونه‌های چیپس با استفاده از آکریلامید در سطح



شکل ۱. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون ODS-H-C18 Optimal بر شکل پیک محلول استاندارد ۵۰۰۰  $\mu\text{g/L}$  آکرلامید در آب دیونیزه با استفاده از ترکیب های مختلف فاز متحرک و طول موجهای شناسایی گوناگون (الف) ترکیب ۳٪ اسید استیک ۵ mM و ۹۷٪ استونیتریل به عنوان فاز متحرک، طول موج ۲۱۰ nm (ب) ترکیب ۳٪ اسید استیک ۵ mM و ۹۷٪ استونیتریل به عنوان فاز متحرک، طول موج ۲۲۶ nm (ج) ترکیب ۹۰٪ اسید استیک ۵ mM و ۱۰٪ استونیتریل به عنوان فاز متحرک، طول موج ۲۱۰ nm (شدت جریان ۰/۵ mL/min)

وجود نویز در نزدیکی پیک آکرلامید بود (شکل ۲). منحنی کالیبراسیون استاندارد که با این روش ترسیم شد در محدوده ۱۰۰-۱۰۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب کاملاً خطی و ضریب همبستگی ( $R^2$ ) آن ۰/۹۹۹ و معادله رگرسیون مربوط به آن  $Y = 94.75X - 1835$  به دست آمد.

در ادامه با توجه به غیر قابل قبول بودن شرایط فوق، ترکیب فاز متحرک به ۱۰۰٪ آب دیونیزه تغییر پیدا کرد و طول موج شناسایی به ۲۰۰ نانومتر کاهش یافت. پس از تزریق محلول های استاندارد به دستگاه کروماتوگرافی مایع، پیک آکرلامید در دقیقه ۲/۹ ظاهر شد که دارای شکل مناسب، تیزی مطلوب و عدم



شکل ۲. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون ODS-H-C18 Optimal بر شکل پیک محلول استاندارد ۱۰۰۰ µg/L آکرلامید در آب دیونیزه با استفاده از ترکیب ۱۰۰٪ آب دیونیزه به عنوان فاز متحرک و طول موج شناسایی ۲۰۰ nm (شدت جریان ۰/۵ mL/min)

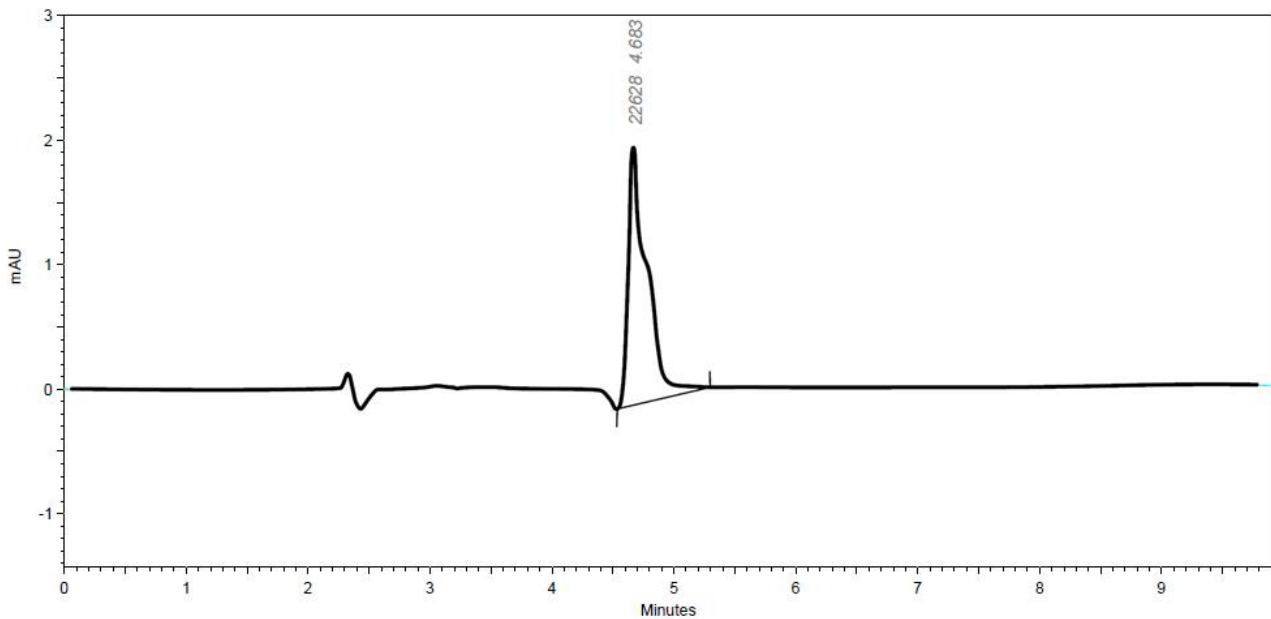
حجمی) به عنوان فاز متحرک بهره گرفته شد. در نتیجه پیک آکرلامید در حدود دقیقه ۴/۴۶ ظاهر شد. در غلظت ۱۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب یک پیک مزاحم در فاصله بسیار نزدیکی به پیک آکرلامید ظاهر گردید. با افزایش غلظت آکرلامید به ۱۵۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب، پیک مزاحم تقریباً محو شد اما شکل پیک آکرلامید حالت پهن موج دار و شانه دار داشت. بنابراین، این روش برای شناسایی پیک آکرلامید مناسب نبود. اما، هنگامی که از مخلوط دو حلال آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت ۹۰٪ به ۱۰٪ (حجمی-حجمی) به عنوان فاز متحرک استفاده شد، پیک آکرلامید در حدود دقیقه ۴/۶۸ جدا شد (شکل ۳) و مشکل بروز پیک مزاحم و شانه داری پیک های استاندارد آکرلامید نیز تا حدی مرتفع گشت که این موضوع احتمالاً به دلیل افزایش قطبیت فاز حلال بود.

سپس منحنی کالیبراسیون ۵ نقطه ای استاندارد آکرلامید در محدوده غلظت ۱۰۰-۵۰۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب با موفقیت ترسیم گردید که معادله رگرسیون منحنی به صورت  $Y = 13.87X + 788.0$  و ضریب همبستگی  $(R^2) = 0.990$  به دست آمد. به منظور اندازه‌گیری درصد بازیافت این روش، نمونه‌های چپس سیب زمینی در سطح ۱۲۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم چپس سیب زمینی و با دو تکرار اسپایک شدند و بعد آکرلامید با استفاده از متانول استخراج و به دستگاه تزریق شد. نتایج گراف‌های به دست آمده از دستگاه نشان داد که پیک آکرلامید در دقیقه ۴/۶۸ دیده نشد و دو پیک بسیار نزدیک به هم در دقایق ۴/۵۸ و ۴/۸۳ دیده شد (شکل ۴).

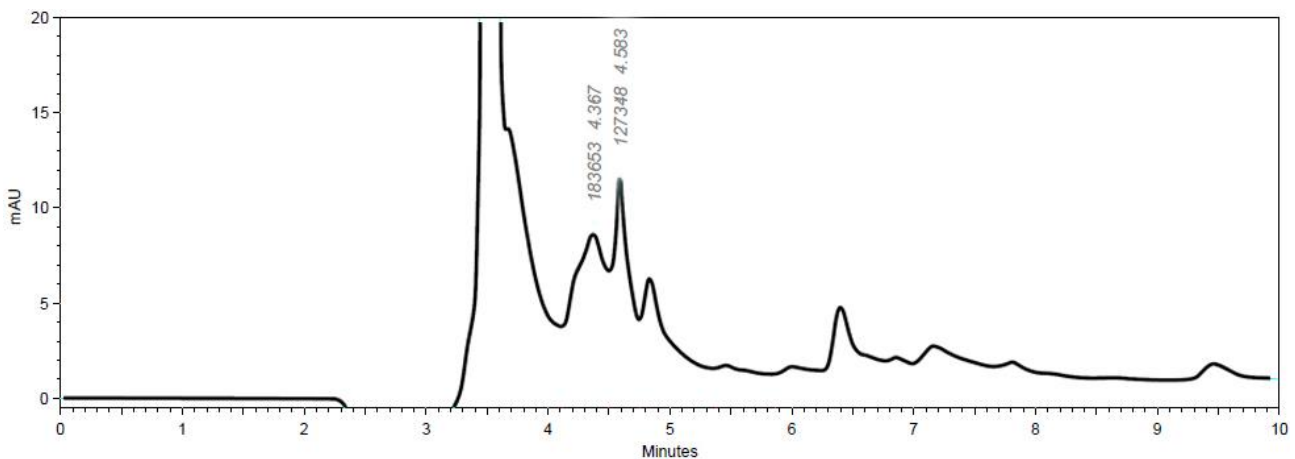
آنگاه به منظور بررسی درصد بازیافت این روش، نمونه های چپس سیب زمینی در سطح ۱۰۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم چپس سیب زمینی و با دوبر تکرار توسط آکرلامید اسپایک شده و بعد استخراج آکرلامید از نمونه های چپس سیب زمینی با استفاده از روش استخراج بوسیله متانول انجام پذیرفت. آنگاه نمونه های چپس استخراج شده به دستگاه تزریق گردید. پس از تزریق نمونه های چپس اسپایک شده، شکل پیک های آکرلامید بسیار نامناسب بود و یک افت شدید قبل از ظهور پیک اصلی و فاصله زیاد از خط پایه و نداشتن ارتفاع مناسب پیک‌ها مشاهده شد. به بیان دیگر استفاده از ستون غیرقطبی ODS-H-C18 Optimal که در حالت آخر با استفاده از ترکیب ۱۰۰٪ آب دیونیزه به عنوان فاز متحرک و بهره‌مندی از طول موج ۲۰۰ نانومتر جهت شناسایی، پیک مناسبی برای محلول‌های استاندارد آکرلامید داده بود، در مورد نمونه‌های چپس سیب زمینی استخراج شده مناسب نبود و این بدان معنی بود که این ستون توانایی تفکیک و جداسازی پیک‌های مزاحم از پیک آکرلامید را در ماتریکس پیچیده چپس سیب زمینی ندارد.

#### اثر شرایط مختلف آزمایش با استفاده از ستون Sphere-Image 80-5 ODS 2 جهت اندازه‌گیری آکرلامید

جهت این امر محلول‌های استاندارد آکرلامید در غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب دیونیزه ساخته شد. پس از تزریق نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی مایع با استفاده از ستون غیر قطبی Sphere-Image 80-5 ODS 2، شناسایی در طول موج ۲۰۰ نانومتر و با استفاده از ترکیب‌های مختلف فاز متحرک انجام پذیرفت. ابتدا از مخلوط دو حلال آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت ۸۶/۵٪ به ۱۳/۵٪ (حجمی-حجمی)



شکل ۳. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون Sphere-Image 80-5 ODS 2 بر شکل پیک محلول استاندارد ۱۵۰۰ µg/L آکرلامید در آب دیونیزه با استفاده از ترکیب ۹۰٪ آب دیونیزه و ۱۰٪ استونیتریل به عنوان فاز متحرک و طول موج شناسایی ۲۰۰ nm (شدت جریان ۰/۵ mL/min)



شکل ۴. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون Sphere-Image 80-5 ODS 2 در جداسازی پیک آکرلامید استخراج شده بوسیله روش استخراجی با حلال متانول از نمونه چیپس سیب زمینی اسپایک شده در سطح ۱۲۰۰ µg/kg با آکرلامید (ترکیب ۹۰٪ آب دیونیزه و ۱۰٪ استونیتریل به عنوان فاز متحرک، طول موج ۲۰۰ nm، شدت جریان ۰/۵ mL/min)

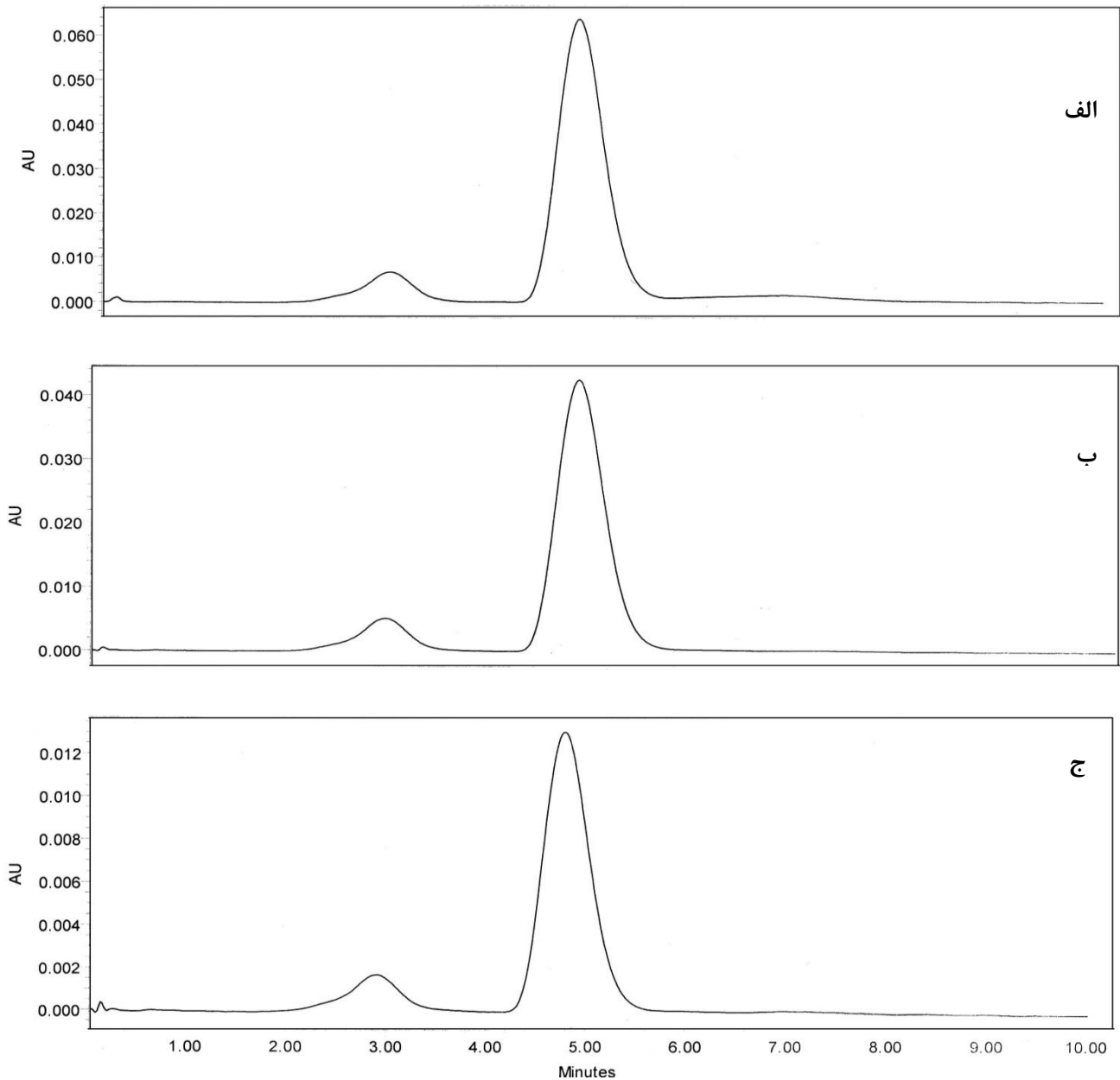
تزریق نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی مایع با استفاده از ستون آبدوست Zorbax Hilic plus، شناسایی در سه طول موج ۲۰۰، ۲۱۰ و ۲۲۶ نانومتر انجام پذیرفت. در نتیجه پیک آکرلامید در دقیقه ۴/۹۵ ظاهر شد (شکل ۵-الف، ۵-ب و ۵-ج) که دارای شکلی مناسب بدون هیچ گونه پیک مزاحم در نزدیکی پیک اصلی بود. بررسی منحنی‌های کروماتوگرام نشان داد بیشترین شدت جذب و سطح زیر پیک آکرلامید با استفاده از طول موج ۲۰۰ نانومتر (شکل ۵-الف) و کمترین شدت جذب و سطح زیر پیک آکرلامید با استفاده از طول موج ۲۲۶ نانومتر به دست آمد (شکل ۵-ج).

این امر نشانگر آن بود که پیک آکرلامید در دقیقه ۴/۶۸ با پیک مزاحم دقیقه ۴/۵۸ هم پوشانی داده و ادغام شده بود و کاربرد ستون Sphere-Image 80-5 ODS 2 در کنار استفاده از مخلوط آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت ۹۰٪ به ۱۰٪ به عنوان فاز متحرک و طول موج شناسایی ۲۰۰ نانومتر، امکان جداسازی پیک آکرلامید از این پیک مزاحم را نداشت.

#### اثر شرایط مختلف آزمایش با استفاده از ستون Zorbax Hilic plus جهت اندازه‌گیری آکرلامید

در این راستا، ابتدا محلول استاندارد آکرلامید با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب دیونیزه تهیه شد. پس از

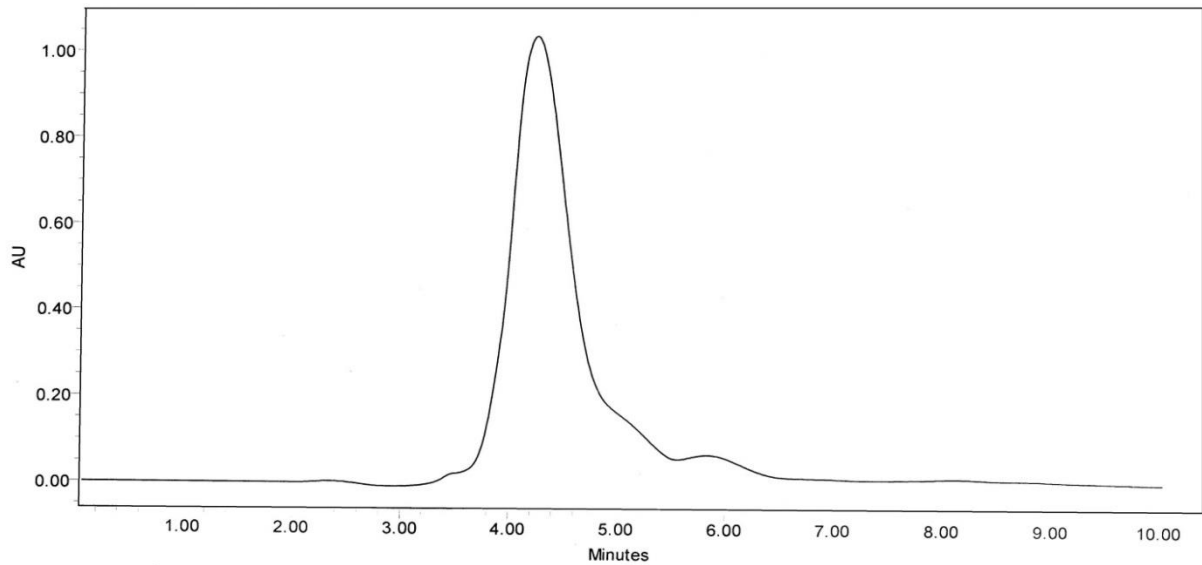




شکل ۵. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون Zorbax Hilic Plus بر شدت جذب و شکل پیک محلول استاندارد ۲۰۰۰  $\mu\text{g/L}$  آکریلامید در آب دیونیزه در طول موج‌های مختلف (الف) طول موج ۲۰۰ nm، (ب) طول موج ۲۱۰ nm، (ج) طول موج ۲۲۶ nm (فاز متحرک ۱۰٪ آب دیونیزه، شدت جریان ۰/۲mL/min)

چیپس سیب زمینی نیز بهره گرفته شد. آنگاه به منظور بررسی کفایت روش آزمون در جداسازی آکریلامید از ماتریکس چیپس سیب زمینی، نمونه‌های چیپس در سطح ۱۲۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس اسپایک شدند و بعد مراحل استخراج آکریلامید از نمونه‌های چیپس سیب زمینی با استفاده از متانول صورت پذیرفت. پس از تزریق نمونه‌های چیپس استخراج شده به دستگاه، در حدود دقیقه ۴/۳۰ یک پیک بزرگ مزاحم ظاهر شد که با پیک دقیقه ۴/۹۵ آکریلامید هم پوشانی داشت (شکل ۶).

دلیل این امر احتمالاً به ساختار شیمیایی آکریلامید به عنوان مشتق اسیدهای کربوکسیلیک بر میگردد. (Gokmen et al. 2005) در تحقیقات خود اشاره داشتند از آنجائیکه آکریلامید یکی از مشتقات اسیدهای کربوکسیلیک است، حداکثر جذب آن در محدوده طول موج ۱۹۵ نانومتر تا ۲۰۵ نانومتر می باشد. البته باید اشاره داشت در این پژوهش آکریلامید در طول موج ۲۲۶ نانومتر نیز به دلیل پیوند دوگانه بین کربن  $C_1$  و  $C_2$  عملاً از خود جذب نشان داد که شدت جذب آن حدود ۵ برابر کمتر از طول موج ۲۰۰ نانومتر بود. بنابراین از طول موج ۲۰۰ نانومتر جهت شناسایی پیک آکریلامید در مورد محلول‌های استخراجی



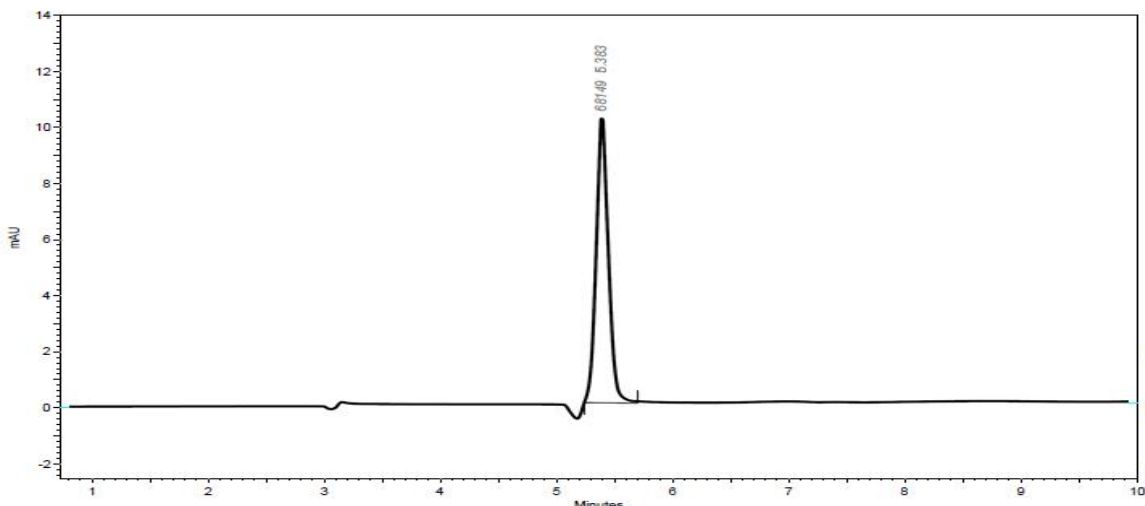
شکل ۶. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون **Zorbax Hilic Plus** در جداسازی پیک آکرلامید استخراج شده بوسیله روش استخراجی با حلال متانول از نمونه‌های چیپس سیب زمینی اسپایک شده در سطح  $1200 \mu\text{g}/\text{kg}$  با آکرلامید (طول موج  $200 \text{ nm}$ ،  $100\%$  آب دیونیزه به عنوان فاز متحرک، شدت جریان  $0.5 \text{ mL}/\text{min}$ )

های آمینه بر پایه سیلیکا می باشد. سپس محلول‌های استاندارد آکرلامید در غلظت های  $100$ ،  $500$ ،  $1500$ ،  $2500$  و  $5000$  میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب دیونیزه ساخته شد و به دستگاه تزریق شد. در نتیجه پیک آکرلامید در حدود دقیقه  $5/36$  به خوبی و با شکل مناسب ظاهر گردید (شکل ۷). این پیک‌ها فاقد مشکل شانه داری یا پیک مزاحم در نزدیکی خود بودند. منحنی کالیبراسیون استاندارد که با این روش ترسیم شد در محدوده  $100-5000$  میکروگرم آکرلامید در هر لیتر آب دیونیزه کاملاً خطی بوده و ضریب همبستگی ( $R^2$ ) آن  $0.997$  و معادله رگرسیون مربوط به آن  $Y = 13.62X - 1042.3$  بود.

این امر بیانگر آن بود که کاربرد ستون **Zorbax Hilic Plus**، در کنار استفاده از ترکیب  $100\%$  آب دیونیزه به عنوان فاز متحرک و شناسایی در سه طول موج  $200$ ،  $210$  و  $226$  نانومتر، نیز نتوانست منجر به جداسازی پیک آکرلامید از پیک مزاحم مجاور آن در ماتریکس چیپس سیب زمینی گردد.

#### اثر شرایط مختلف آزمایش با استفاده از ستون **Lichrosorb-100 NH2** جهت اندازه‌گیری آکرلامید

جهت این امر اثر کاربرد ستون آمینه **Lichrosorb-100 NH2** و فاز متحرک با ترکیب آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت  $94/4\%$  به  $5/6\%$  (حجمی-حجمی) در طول موج  $200$  نانومتر مورد مطالعه قرار گرفت. این ستون یکی از انواع متداول ستون-

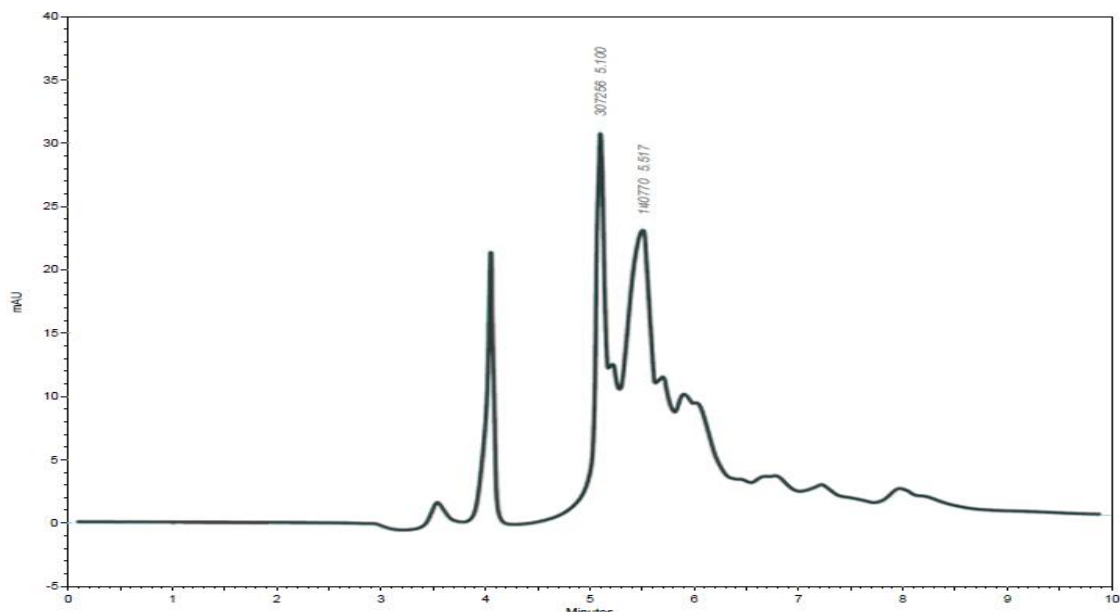


شکل ۷. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون آمینه **Lichrosorb-100 NH2** بر شکل پیک محلول استاندارد  $5000 \mu\text{g}/\text{L}$  آکرلامید در آب دیونیزه با استفاده از ترکیب  $94/4\%$  آب دیونیزه و  $5/6\%$  استونیتریل به عنوان فاز متحرک و طول موج شناسایی  $200 \text{ nm}$  (شدت جریان  $0.5 \text{ mL}/\text{min}$ )

شایان ذکر است در این پژوهش استفاده از ترکیب ۱۰۰٪ آب خالص به عنوان فاز متحرک به دلیل افزایش فشار داخلی ستون های کروماتوگرافی و احتمال آسیب رساندن به ساختار این ستون‌ها، عملاً با محدودیت‌هایی در اجرا روبرو بود.

سپس به منظور بررسی درصد بازیافت این روش، نمونه‌های چیپس در سطح ۱۲۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی و با دو تکرار اسپایک شدند و بعد استخراج آکریلامید از نمونه‌های چیپس سیب زمینی بوسیله متانول انجام و به دستگاه تزریق گردیدند. پس از تزریق، در هر دو نمونه چیپس شاهد و چیپس اسپایک شده، یک پیک بزرگ و پهن در حدود دقیقه ۵/۵۱ ظاهر شد (شکل ۸) که درصد بازیافت آن بسیار بالاتر از حد مجاز استاندارد و به میزان ۸۲۱-۴۶۹٪ بود. این موضوع نشان می‌داد یک یا چند پیک مزاحم با پیک آکریلامید (دقیقه ۵/۳۶) هم پوشانی داشته و بنابراین با کاربرد ستون آمینه بر پایه سیلیکای Lichrosorb-100 NH<sub>2</sub> و مخلوط آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت ۹۴/۴٪ به ۵/۶٪ به عنوان فاز متحرک، نمی‌توان آکریلامید را شناسایی نمود.

نتایج کاربرد ترکیبات مختلف به عنوان فاز متحرک شامل ترکیب ۹۷٪ استونیتریل تا ترکیب ۱۰۰٪ آب دیونیزه در جداسازی پیک آکریلامید در این پژوهش نشان داد ضعیف ترین کارایی آنالیز با استفاده از مخلوط دو حلال استونیتریل و اسید استیک در نسبت ۹۷٪ به ۳٪ (حجمی-حجمی) به عنوان فاز متحرک بود. سپس با کاهش درصد استونیتریل و افزایش سهم فاز آبی، نتایج بهبود یافت به طوری که بهترین کارایی آنالیز با استفاده از مخلوط دو حلال آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت ۹۴/۴٪ به ۵/۶٪ (حجمی-حجمی) حاصل گردید. در همین راستا (Paleologos & Kontominas, 2005) در تحقیقات خود در زمینه اندازه‌گیری آکریلامید با استفاده از روش HPLC-PDA به نتایج مشابه ای دست یافتند. آنها اشاره داشتند که افزودن حلال های آلی مانند استونیتریل به فاز آبی سبب کوتاهتر شدن زمان شستشو و عبور سیال و بهبود قابلیت شناسایی پیک از راه تقویت سیگنال آن و کاهش زمان آنالیز و جداسازی آکریلامید می‌گردد. آنها از مخلوط دو حلال استونیتریل و فاز آبی حاوی اسید سولفوریک ۰/۰۱ مولار در نسبت ۲۰٪ به ۸۰٪ (حجمی-حجمی) به عنوان فاز متحرک در طی مراحل جداسازی پیک آکریلامید استفاده نمودند. همچنین



شکل ۸. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون آمینه Lichrosorb-100 NH<sub>2</sub> در جداسازی پیک آکریلامید استخراج شده بوسیله روش استخراجی با حلال متانول از نمونه چیپس سیب زمینی اسپایک شده در سطح ۱۲۰۰ μg/kg با آکریلامید (طول موج ۲۰۰ nm، ترکیب ۹۴/۴٪ آب دیونیزه و ۵/۶٪ استونیتریل به عنوان فاز متحرک، شدت جریان ۰/۵ mL/min)

شد. زیرا استفاده از آب دیونیزه به عنوان حلال استخراجی سبب استخراج همزمان سایر ترکیبات محلول در آب مانند مونو، دی و پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه، و اسیدهای آلی نیز

شایان ذکر است در این پژوهش و از میان حلال‌های رایج جهت استخراج آکریلامید مانند آب دیونیزه، متانول، استونیتریل و استون، نهایتاً از متانول به عنوان حلال استخراجی استفاده

در ادامه مراحل آماده‌سازی نمونه باید تغلیظ گردد که با توجه به حجم عصاره حاصله امری دشوار بود.

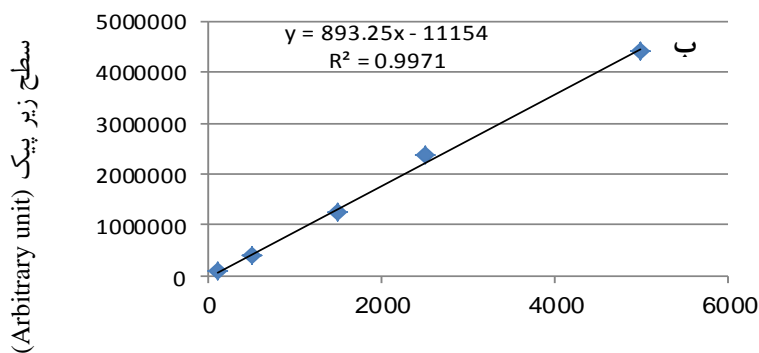
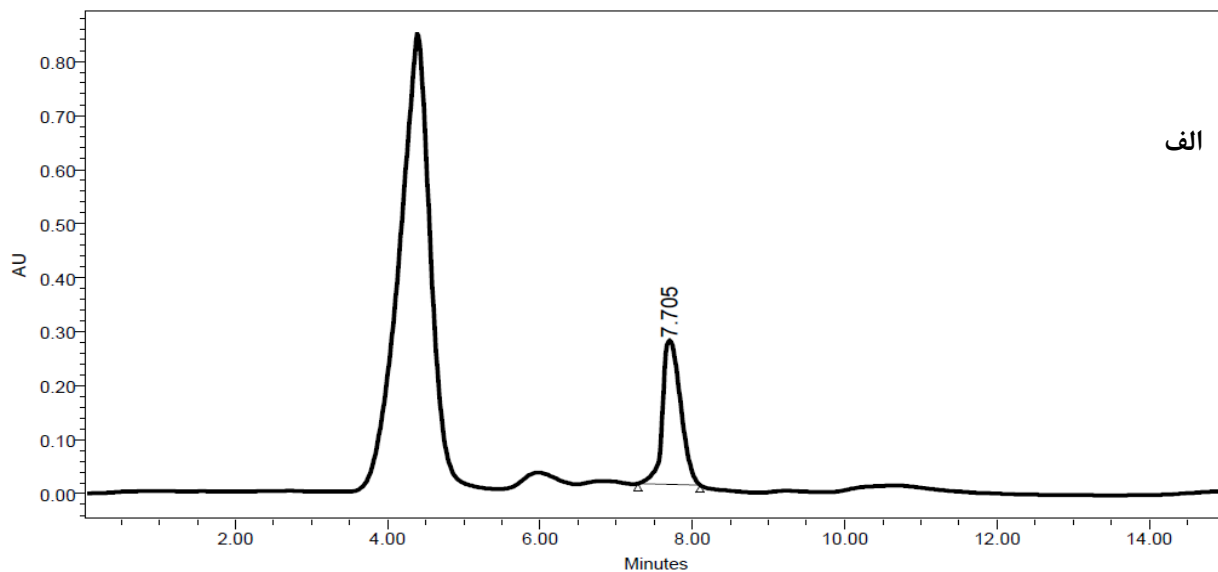
#### اثر شرایط مختلف آزمایش با استفاده از ستون Shodex Asahipak NH2P-50 4E جهت اندازه‌گیری آکریلامید

بدین منظور از مخلوط دو حلال آب دیونیزه و استونیتریل در نسبت ۹۴/۴٪ به ۵/۶٪ (حجمی-حجمی) به عنوان فاز متحرک و طول موج شناسایی ۲۰۰ نانومتر استفاده گردید. سپس محلول‌های استاندارد آکریلامید در غلظت های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۵۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر لیتر آب دیونیزه ساخته شد و با استفاده از کاربرد ستون آمینه Shodex Asahipak NH2P-50 4E به دستگاه تزریق شد. این ستون یکی از انواع ستون‌های آمینه نسل جدید و بر پایه ژل پلی وینیل الکل می‌باشد. به این ترتیب پیک آکریلامید در حدود دقیقه ۷/۷۰ به خوبی و بدون وجود پیک مزاحم در نزدیکی آن جداسازی شد (شکل ۹-الف). منحنی کالیبراسیون استاندارد می‌باشد که با این روش ترسیم شد در محدوده ۵۰۰-۱۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر لیتر آب کاملاً خطی بوده (شکل ۹-ب) و لذا این محدوده به عنوان محدوده دینامیکی خطی (LDR) به دست آمد. همچنین، ضریب همبستگی ( $R^2$ ) آن ۰/۹۹۷ و معادله رگرسیون مربوط به آن  $Y = 893.25X - 11154$  بود.

به منظور بررسی درصد بازیافت این روش، نمونه‌های چیپس در سه سطح غلظت ۵۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۴۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی و در هر سطح با دو بار تکرار ( $n=2$ )، اسپایک شدند و سپس استخراج آکریلامید از نمونه‌های چیپس با استفاده از روش استخراج بوسیله متانول انجام پذیرفت. پس از تزریق نمونه‌های استخراج شده به دستگاه کروماتوگرافی مایع با استفاده از ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E، پیک آکریلامید با موفقیت و در حدود دقیقه ۷/۶۸ به خوبی جداسازی گردید. در شکل ۱۰ کروماتوگرام مربوط به نمونه چیپس سیب زمینی اسپایک شده در سطح غلظت ۱۲۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی آمده است.

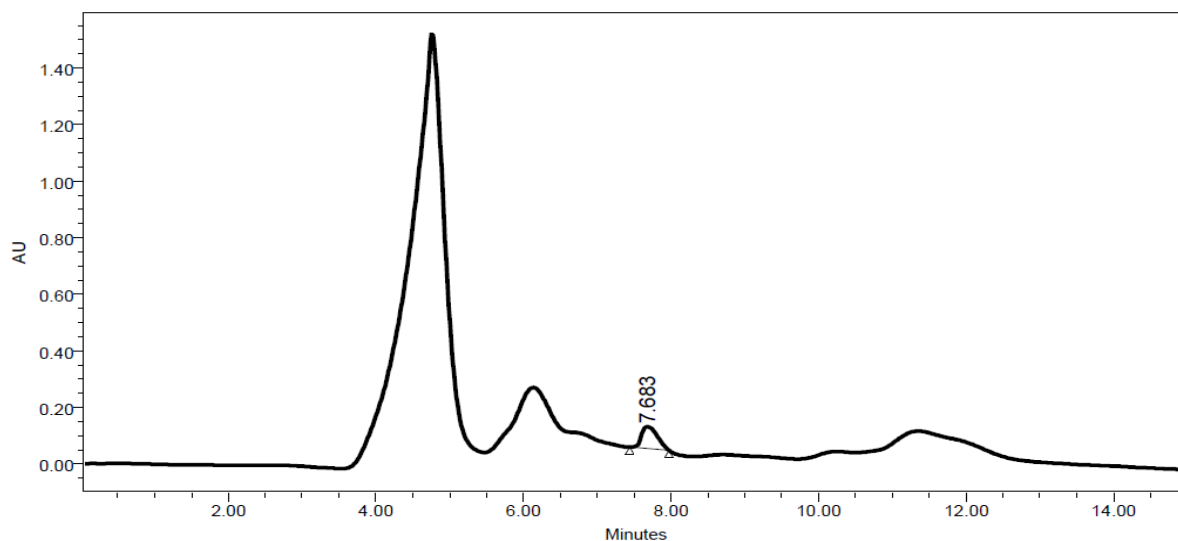
میانگین درصد بازیافت در مورد نمونه‌های چیپس اسپایک شده در سطح غلظت ۵۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۴۰۰ میکروگرم آکریلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی با دو بار تکرار ( $n=2$ )، با موفقیت در محدوده  $95/9 \pm 1/3$ ٪ تا  $102/2 \pm 1/6$ ٪ به دست آمد (جدول ۳).

می‌گردد (Fernandes & Soares, 2007; Gokmen *et al.*, 2005). بنابر این هنگام استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و استخراج با آب دیونیزه در اکثر تحقیقات گذشته، جهت کاهش خطر مداخله‌کنندگی ماتریکس نمونه غالباً از یک مرحله پاکسازی با کارتریج‌های فاز جامد استفاده شده بود که خود منجر به پیچیدگی بیشتر و زمان بر بودن روش آزمون می‌گردید (Geng *et al.*, 2008; Mastovska & Lehotay, 2006; Wang *et al.*, 2013). همچنین دلیل دیگر انتخاب متانول را می‌توان در مقایسه میزان قطبیت چهار حلال فوق و همچنین میزان حلالیت آکریلامید در این حلال‌ها دانست. شاخص قطبیت آب، استونیتریل، متانول و استون به ترتیب ۹، ۵/۸، ۵/۱ و ۵/۱ است. همچنین میزان حلالیت آکریلامید در آب، متانول، استونیتریل و استون به ترتیب ۲۱۵۵، ۱۵۵۰، ۳۹۶ و ۶۳ گرم در لیتر می‌باشد (Bermudo *et al.*, 2006b). بنابراین پس از آب، میزان قطبیت سه حلال دیگر تقریباً به یکدیگر نزدیک بوده در حالیکه میزان حلالیت آکریلامید در متانول حدود ۴ برابر استونیتریل و ۲۴ برابر استون است. لذا متانول احتمالاً به طرز موثرتری می‌تواند به ماتریکس پیچیده چیپس سیب زمینی نفوذ کرده و سبب استخراج آکریلامید از چیپس سیب زمینی گردد. در تایید این نظر، (Gokmen *et al.*, 2005) در تحقیقات خود به نتایج مشابهی دست یافتند. آنها اعلام کردند از آنجائیکه چیپس سیب زمینی دارای مقادیر بالایی نشاسته است، استخراج اولیه با آب سبب استخراج هم زمان ترکیبات مختلف از ماتریکس نمونه و تشکیل یک محلول بسیار غلیظ شده و دستیابی به یک لایه شفاف پس از سانتریفوژ را دشوار می‌ساخت. از طرف دیگر متانول دارای سازگاری بیشتری با ماتریکس‌های غذایی حاوی مقادیر بالای چربی مانند چیپس سیب زمینی (محتوی ۳۵٪-۳۰٪ چربی) به عنوان حلال استخراجی است و آکریلامید پس از آب، دارای حلالیت بالایی در متانول است که این امر سبب افزایش راندمان استخراج آکریلامید از چیپس سیب زمینی با متانول گردید. (Gokmen & Senyuva, 2006) نیز اشاره داشتند که از آنجائیکه متانول، پلی ساکاریدهایی مانند نشاسته و پکتین را استخراج نمی‌کند، بنابراین با کاربرد متانول جهت استخراج آکریلامید از چیپس سیب زمینی، عصاره استخراجی شفافتری در مقایسه با کاربرد آب دیونیزه ایجاد می‌شود. همچنین در روش استخراج آبی به دلیل تورم نشاسته سیب زمینی، نسبت حلال به نمونه غالباً بیشتر از ۱۰ می‌گردد تا مقادیر کافی از عصاره برای ادامه مراحل استخراج به دست آید. این عصاره استخراجی



غلظت محلول استاندارد آکرلامید در آب ( $\mu\text{g/L}$ )

شکل ۹. الف) کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E بر شکل پیک محلول استاندارد  $5000 \mu\text{g/L}$  آکرلامید در آب با استفاده از ترکیب  $94/4\%$  آب دیونیزه و  $5/6\%$  استونیتریل به عنوان فاز متحرک و طول موج شناسایی  $200 \text{ nm}$  (شدت جریان  $0.5 \text{ mL/min}$ ) (ب) منحنی کالیبراسیون استاندارد آکرلامید در آب دیونیزه در محدوده غلظت  $100-5000 \mu\text{g/L}$



شکل ۱۰. کروماتوگرام مربوط به اثر کاربرد ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E در جداسازی پیک آکرلامید استخراج شده بوسیله روش استخراجی با حلال متانول از نمونه چپس سیب زمینی اسپایک شده در سطح  $1200 \mu\text{g/kg}$  با آکرلامید (ترکیب  $94/4\%$  آب دیونیزه و  $5/6\%$  استونیتریل به عنوان فاز متحرک، طول موج  $200 \text{ nm}$ ، شدت جریان  $0.5 \text{ mL/min}$ )

جدول ۳. اثر کاربرد ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E در تعیین درصد بازیافت نمونه‌های چپیس سیب زمینی اسپایک شده در سطح ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۰۰ و ۲۴۰۰  $\mu\text{g}/\text{kg}$  با آکرلامید ( $n=2$ )

درصد بازیافت <sup>c</sup> (%) ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	غلظت نهایی <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	غلظت اولیه <sup>a</sup> ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ )	سطح زیر پیک (واحد اختیاری) ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ) ( $\times 10^3$ )	غلظت تزریق شده به چپیس سیب زمینی ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
N/A	۱۱۱ ± ۱۴	۱۱۱ ± ۱۴	۱۸۳ ± ۱۱	نمونه شاهد <sup>d</sup>
۱۶۵ ± ۵/۷	۸۲ ± ۳	۸۲ ± ۳	۶۶ ± ۲	۵۰
۱۰۶/۱ ± ۱/۶	۱۰۶ ± ۲	۱۹۱ ± ۲	۱۶۰ ± ۱۴	۱۰۰
۹۷/۴ ± ۱/۷	۲۴۳ ± ۴	۳۲۹ ± ۴	۲۸۲ ± ۴	۲۵۰
۹۵/۹ ± ۱/۳	۴۸۰ ± ۶	۶۰۰ ± ۶	۵۶۲ ± ۵	۵۰۰
۱۰۲/۲ ± ۱/۶	۱۲۲۷ ± ۱۸	۱۳۴۷ ± ۱۹	۱۱۴۱ ± ۱۴	۱۲۰۰
۹۶/۴ ± ۰/۲	۲۳۱۳ ± ۶	۲۴۳۳ ± ۷	۱۹۸۹ ± ۵	۲۴۰۰

a: غلظت اولیه به طور مستقیم از منحنی کالیبراسیون و با استفاده از معادله رگرسیون محاسبه گردید.

b: غلظت نهایی با تاثیر فاکتور پیش تغلیظ و کم کردن غلظت آکرلامید در نمونه شاهد محاسبه گردید.

c: درصد ریکاوری از تقسیم غلظت نهایی بر غلظت اسپایک شده، تعیین گردید.

d: نمونه شاهد، چپیس سیب زمینی آسیاب شده بدون آغشته سازی با آکرلامید است.

N/A: غیر قابل اجرا

مایع است در اکثر مقالات از انجام مراحل پاکسازی با کارتریج فاز جامد استفاده شده بود ( Bermudo *et al.*, 2006a; Rufian & Morales, 2006). به عنوان نمونه در تحقیقات فوق ( Wang *et al.*, 2013) از کارتریج فاز جامد Elut-Accuate و Gokmen *et al.* (2005) و Geng *et al.* (2008) از کارتریج فاز جامد Oasis HLB استفاده نمودند که منجر به طولانی شدن مراحل استخراج و افزایش هزینه روش جداسازی آکرلامید می گردید. آنچه به عنوان یک مزیت در رابطه با کاربرد ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E در این پژوهش به دست آمد عدم نیاز به انجام مراحل زمانبر و پر هزینه پاکسازی با فاز جامد بود. ستون Shodex NH2P-50 4E از انواع ستون‌های آمینه نسل جدید بوده و دارای گروه‌های فعال پلی آمین است که بر خلاف ستون‌های آمینه متداول (مانند Lichrosorb-100 NH2)، به جای پایه متداول سیلیکا، به یک نوع ژل سخت پلیمری آبدوست به نام پلی وینیل الکل ژل به عنوان ترکیب پایه متصل بوده و دارای پایداری شیمیایی بالایی می‌باشد ( Showa-Denko *et al.*, 2013). این امر مشکل کاهش قدرت بازداری و جداسازی ستون‌های قبلی را مرتفع نمود (Acworth *et al.*, 2011). به منظور اعتبار بخشی و بررسی دقت نتایج این روش، آزمون تکرار پذیری در خلال چند روز مورد استفاده قرار گرفت. مطابق جدول شماره ۴، نخست شاخص‌های میانگین و انحراف استاندارد در مورد داده‌های سطح زیر پیک محاسبه گردید. سپس شاخص انحراف استاندارد نسبی (RSD) برابر ۴/۳۹٪ به دست آمد که حکایت از تکرار پذیری مناسب روش آزمون با

در مطالعات پیشین Wang *et al.* (2013) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و آشکارگر طیف سنجی نوری با آرایش دیودی (HPLC-DAD) همراه با کاربرد ستون Hypersil ODS-C18، به درصد بازیافت ۱۰۳-۸۹٪ در غذاهای چینی پخته شده و یا سرخ شده دست یافتند. همچنین Gokmen *et al.* (2005) با استفاده از روش HPLC-DAD همراه با کاربرد ستون آبدوست Atlantis HILIC، درصد بازیافت را در محدوده ۹۶/۲-۹۲/۸٪ در نمونه‌های چپیس سیب زمینی محاسبه نمودند. در یک مطالعه دیگر، Geng *et al.* (2008) با استفاده از روش HPLC-DAD و ستون دفع یونی Hamilton HC-75H<sup>+</sup>، درصد بازیافت را ۱۰۴-۹۲/۵٪ در چپیس سیب زمینی، بیسکوئیت و کلوچه گزارش نمودند. شایان ذکر است در تحقیقات گذشته در زمینه اندازه-گیری آکرلامید در مواد غذایی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع، استفاده از ستون‌های آمینه بر پایه سیلیکا و یا ستون‌های آمینه نسل جدید بر پایه پلی وینیل الکل مانند آنچه در این پژوهش با کاربرد موفقیت آمیز ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E تحقق پذیرفت، دیده نشده است و عمدتاً از ستون‌های آمینه به منظور جداسازی مونو و الیگوساکاریدها استفاده شده بود (Hvizd *et al.*, 2011). از طرف دیگر ستون‌های متداول مورد استفاده همراه با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا غالباً بر پایه اکتا دسیل سیلیکا (ODS-C<sub>18</sub>)، یا از نوع برهمکنش آبدوست (HILIC) و یا از نوع دفع یون (IE) می‌باشند. اما از آنجائیکه آکرلامید یک مولکول بسیار قطبی با قابلیت بازداری و جداسازی ضعیف روی ستون‌های متداول روش کروماتوگرافی

تسخیر کننده الکترون (GC-ECD) و ستون پلی اتیلن گلیکولی HP-INNOWax. شاخص RSD را برای نمونه های بال مرغ سرخ شده و چیپس سیب زمینی در محدوده ۵/۹-۸/۰٪ محاسبه نمودند. همچنین (Bermudo *et al.* (2006b) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و دو آشکارگر طیف سنجی جرمی (LC- MS/MS) و ستون غیرقطبی ODS-80 TS، به شاخص RSD ۸٪ در بیسکوئیت، چیپس سیب زمینی، نان و شکلات دست یافتند.

استفاده از ستون آمینه NH2P-50 4E داشت. در یک تحقیق مشابه، Paleologos & Kontominas (2005) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و آشکارگر طیف سنجی نوری مرئی-ماوراء بنفش (HPLC-UV-vis) و ستون قطبی Aminex HPX-87H، شاخص RSD را در محدوده ۵/۰-۴/۰٪ در سیب زمینی سرخ شده، شکلات، پودر کاکائو، پودر قهوه و مرغ خام گزارش نمودند. در مطالعه ای دیگر، Zhang *et al.* (2006) با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی و آشکارگر

جدول ۴. اثر کاربرد ستون آمینه Shodex NH2P-50 4E در تعیین شاخص‌های میانگین، انحراف استاندارد (SD) و انحراف استاندارد نسبی (RSD) داده های سطح زیر پیک نمونه های چیپس سیب زمینی اسپایک شده در سطح ۱۲۰۰ µg/kg با آکرلامید (n=۵)

سطح زیر پیک نمونه های چیپس اسپایک شده (۱۲۰۰ µg/kg) (×۱۰ <sup>۲</sup> )					میانگین	انحراف استاندارد	انحراف استاندارد نسبی
۱	۲	۳	۴	۵	(Mean)	(SD)	(RSD) %
۱۴۲۱	۱۵۹۰	۱۵۰۳	۱۵۶۸	۱۵۵۹	۱۵۲۶/۸	۶۷۰۴۵/۹۸	۴/۳۹۱

در این پژوهش با بررسی نقش ستون‌های کروماتوگرافی در جداسازی و اندازه‌گیری آکرلامید در چیپس سیب زمینی، ابتدا از ستون‌های غیر قطبی و بر پایه اکتا دسیل سیلیکای ODS-H-C18 Optimal و Sphere-Image 80-5 ODS 2، ستون آبدوست Zorbax Hilic Plus و ستون آمینه بر پایه سیلیکای Lichrosorb-100 NH2 بهره گرفته شد. کاربرد این ستون‌ها علی رغم آن که منجر به ظهور پیک مناسب در هنگام تزریق محلول‌های استاندارد آکرلامید شده بود، اما در هنگام تزریق نمونه‌های چیپس سیب زمینی اسپایک شده با آکرلامید، شکل و خصوصیات ظاهری پیک آکرلامید مناسب نبود و عمدتاً یک پیک بسیار پهن و بزرگ تشکیل می‌گردید که نشانگر ادغام یک یا چند پیک مزاحم و هم پوشانی آنها با پیک آکرلامید و عدم کفایت روش آزمون در تفکیک و جداسازی پیک‌های مزاحم از پیک آکرلامید در ماتریکس پیچیده چیپس سیب زمینی استخراج شده را داشت. سپس از ستون آمینه نسل جدید برخلاف ستون آمینه قبلی، به جای پایه غیر قطبی سیلیکا، حاوی یک ژل آبدوست قطبی به نام پلی وینیل الکل به عنوان ترکیب پایه‌ای بود. کاربرد این ستون منجر به جداسازی مطلوب پیک آکرلامید در حدود دقیقه ۷/۶۸ بدون مداخله پیک‌های ماتریکس نمونه و نتایج مناسب آزمون درصد بازیافت نمونه‌های چیپس سیب زمینی (۱۰۲/۲٪ - ۹۵/۹٪) گردید. این امر احتمالاً به دلیل قطبیت بالای ستون آمینه NH2P-50 4E بوده است. زیرا آکرلامید که خود یک ترکیب بسیار قطبی است، مدت زمان طولانی‌تری بر روی ستون اقامت می‌کند و به همین دلیل فرآیند جداسازی بهتری در مقایسه با ستون‌های غیر قطبی از

جهت تعیین حد شناسایی (LOD) و حد تعیین مقدار کمی (LOQ) این روش، از آزمون توصیف شده در قسمت اعتباربخشی آزمون استفاده گردید. به این منظور درصد بازیافت در مورد نمونه‌های چیپس اسپایک شده در سطح ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی محاسبه گردید (جدول ۳). سپس حد شناسایی و حد تعیین مقدار کمی روش آزمون با استفاده از ستون آمینه NH2P-50 4E، به ترتیب ۹ و ۲۷ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی به دست آمد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش، مشابه نتایج Wang *et al.* (2013) و Fernandes & Soares (2006) و Govaert *et al.* (2007) بود. Wang *et al.* (2013) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و آشکارگر طیف سنجی نوری با آرایش دیودی (HPLC-DAD) و ستون Hypersil ODS-C18، شاخص‌های LOD و LOQ را به ترتیب ۸ و ۲۵ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم غذاهای چینی پخته شده و یا سرخ شده گزارش کردند. همچنین Fernandes & Soares (2007) با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی و آشکارگر طیف سنجی جرمی (GC-MS) و ستون MDN-12، این شاخص‌ها را به ترتیب ۱۲/۸ و ۳۸/۸ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم چیپس سیب زمینی محاسبه نمودند. Govaert *et al.* (2006) نیز با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و دو آشکارگر طیف سنجی جرمی (LC- MS/MS) و ستون غیرقطبی µ-Bondapak C18، همین شاخص‌ها را به ترتیب ۱۰ و ۲۰ میکروگرم آکرلامید در هر کیلوگرم بیسکوئیت، چیپس سیب زمینی، نان و شکلات به دست آوردند.

زمینی اسپایک شده با آکرلامید، نتایج آزمون نشان داد که با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی غیر قطبی، آبدوست، و آمینه سنتی بر پایه سیلیکا، مشکل مداخله پیک‌های مزاحم و هم پوشانی آنها با پیک آکرلامید به وجود آمده و درصد بازیافت نیز قابل قبول نبود. با کاربرد ستون آمینه نسل جدید Shodex NH2P-50 4E و شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده برای ستون از نظر نوع و نسبت ترکیبات فاز متحرک و طول موج شناسایی، مشکل مداخله پیک‌های مزاحم در هنگام تزریق نمونه‌های استخراج شده آکرلامید از چیپس سیب زمینی به طور کامل برطرف گردید.

نتایج این پژوهش نشان داد که با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارگر طیف سنجی نوری با آرایش دیودی و کاربرد ستون کروماتوگرافی آمینه 4E Shodex NH2P-50 همراه با ترکیب استونیتریل-آب دیونیزه به عنوان فاز متحرک و طول موج ۲۰۰ نانومتر، میتوان به یک روش آسان، مقرون به صرفه و قابل اطمینان جهت اندازه‌گیری آکرلامید در چیپس سیب زمینی دست یافت.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت‌های صورت گرفته توسط پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی پژوهشگاه استاندارد (کرج، ایران)، معاونت پژوهشی دانشگاه تهران (تهران، ایران) و معاونت پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج، ایران) اعلام می‌دارند.

### REFERENCES

- Acworth, I., Crafts, C. & Bailey, B. (2011). Sensitive analysis of commonly used artificial and natural sweeteners including stevia and their impurities and degradation products. *Thermo Fisher Scientific*, 1, 1-6.
- Bent, G., Maragh, P. & Dasgupta, T. (2012). Acrylamide in Caribbean foods—Residual levels and their relation to reducing sugar and asparagines content. *Food Chemistry*, 133, 451-457.
- Bermudo, E., Nunez, O., Moyano, L., Puignou, L. & Galceran, M.T. (2007). Field amplified sample injection-capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for analysis of acrylamide in foodstuffs. *Journal of Chromatography A*, 1159, 225-232.
- Bermudo, E., Nunez, O., Puignou, L. & Galceran, M.T. (2006a). Analysis of acrylamide in food products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1129, 129-134.

خود نشان می‌دهد. در مطالعاتی مشابه و در راستای بررسی برهمکنش آکرلامید با ستون‌های مختلف، (Zhu et al. (2008) اعلام داشتند که استفاده از ستون‌های با خاصیت قطبی نظیر Supleco-Wax-10 یا DB-Wax نسبت به ستون‌های غیرقطبی یا با قطبیت ضعیف بهتر توانستند سبب جداسازی پیک آکرلامید از پیک‌های مزاحم ماتریکس نمونه گردند. Zhang et al. (2006) در مطالعات خود عنوان داشتند که آکرلامید به عنوان یک ترکیب قطبی دارای خاصیت بازدارنده و جداسازی ضعیفی روی ستون‌های غیر قطبی یا با قطبیت ضعیف مانند DB-5 است که منجر به دستیابی به شکل پیک نامناسب می‌گردد. لذا این نویسنده با استفاده از ستون HP-INNOWax با خاصیت قطبی بالا، اقدام به اندازه‌گیری آکرلامید نمود. همچنین (Xu et al. (2013) بیان کردند که استفاده از ستون‌های با قطبیت پایین مانند DB-5 ms سبب دنباله دار شدن و پهن شدن شکل پیک آکرلامید می‌گردد. این محققین از ستون 30 m INNOWax از جنس پلی اتیلن گلیکول برای اندازه‌گیری آکرلامید استفاده کردند.

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثر نوع ستون کروماتوگرافی در تعیین روش اندازه‌گیری آکرلامید در چیپس سیب زمینی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع و آشکارگر طیف سنجی نوری با آرایش دیودی مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور اثر ۵ ستون کروماتوگرافی مختلف در تعیین روش اندازه‌گیری آکرلامید مورد بررسی قرار گرفت. پس از تزریق نمونه‌های چیپس سیب

- Bermudo, E., Moyano, L., Puignou, L. & Galceran, M.T. (2006b). Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica Chimica Acta*, 559, 207-214.
- EFSA (2009). Scientific report of EFSA prepared by data collection and exposure unit (DATEX) on "Monitoring of acrylamide levels in food". *The EFSA Scientific Report*, 285, 1-26.
- Fernandes, J. & Soares, C. (2007). Application of matrix soli phase dispersion in the determination of acryl amide in potato chips. *Journal of Chromatography A*, 1175, 1-6.
- Geng, Z., Jiang, R. & Chen, M. (2008). Determination of acrylamide in starch based foods by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 178-182.
- Ghasemian, S., Rezaei, K., Abedini, R., Poorazarang, H. & Ghaziani, F. (2014). Investigation of different parameters on acrylamide production in



- the fried beef burger using Taguchi experimental design. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 440-448.
- Gokmen, V. & Senyuva, H. Z. (2006). A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. *Journal of Chromatography A*, 1120, 194-198.
- Gokmen, V., Senyuva, H. Z., Acar, J. & Sarioglu, K. (2005). Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1088, 193-199.
- Govaert, Y., Ariseto, A., Vanloco, J., Scheers, E., Frasella, S., Weverbrgh, E., Degrootd, J.M. & Goeyens, L. (2006). Optimisation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. *Analytica Chimica Acta*, 556, 275-280.
- Hvizd, M. G., Bailey, B., Crafts, C., Plante M. & Acworth, I. (2011). Simple separation and detection techniques for the analysis of carbohydrates. *Thermo Fisher Scientific*, 2, 1-8.
- Lee, S., Yoo, M., Koo, M., Kim, H. J., Kim, M., Park, S. & Shin, D. (2013). In-house-validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for survey of acrylamide in various processed foods from Korean market. *Food Science and Nutrition*, 1, 402-407.
- Lee, M., Chang, L. & Dou, J. (2007). Determination of acrylamide in food by solid-phase micro extraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 582, 19-23.
- Mastovska, K. & Lehotay, S. (2006). Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7001-7008.
- Mousavinejad, G., Rezaei, K. & Khodaiyan, F. (2015). Reducing acrylamide in fried potato pancake using baker's yeast, lactobacilli and microalgae. *Quality Assurance & Safety of Crops and Foods*, 7, 779-787.
- paleologos, E. K. & Kontominas M. G. (2005). Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1077, 128-135.
- Rufian, J. A. & Morales, F. J. (2006). Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC-MS method based on a stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, 97, 555-562.
- Showa-Denko, K. K. (2013). Analysis of saccharides in food industry, shodex NH2P-50 series columns. *Technical Notebook*, No.2, 1-28.
- Stobiecka, A., Radecka, H. & Radecki, J. (2007). Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2165-2170.
- Sun, S., Fang, Y. & Xia, Y. (2012). A facile detection of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC. *Food Control*, 26, 220-222.
- Tezcan, F. & Bedia-Erim, F. (2008). On-line stacking techniques for nonaqueous caoillary electrophoretic determination of acrylamide in processed food. *Analytica Chimica Acta*, 617, 196-199.
- Wang, H., Feng, F., Guo, Y., Shuang, S. & Choi, M. M. F. (2013). HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep-fried Chinese foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 7-11.
- Xu, X., He, H., Zhu, Y., Feng, L., Ying, Y., Huang, B., Shen, H., Han, J. & Ren, Y. (2013). Simultaneous determination of 3-monochloropropane-1,2-diol and acrylamide in food by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with coupled column separation. *Analytica Chimica Acta*, 760, 93-99.
- Zhang, Y., Ren, Y., Zhao, H. & Zhang, Y. (2007). Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electro spray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 584, 322-332.
- Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y. & Zhang, Y. (2006). Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. *Journal of Chromatography A*, 1116, 209-216.
- Zhu, Y., Li, G., Duan y., Chen, S., Zhang, C. & Li, Y. (2008). Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector. *Food Chemistry*, 109, 899-908.