

# 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法联合 测定食品中苯并(a)芘

吴敏<sup>1\*</sup>, 李政<sup>2</sup>, 黎翠玉<sup>1</sup>, 杨黎忠<sup>1</sup>, 徐敦明<sup>1</sup>, 周昱<sup>1</sup>

(1. 厦门出入境检验检疫局, 厦门 361026;

2. 江西农业大学食品科学与工程学院, 南昌 330045)

**摘要:** **目的** 采用固相萃取-高效液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)联合测定食品中苯并(a)芘的含量。**方法** 根据不同样品基质对样品提取条件进行了优化, 采用固相萃取柱净化, Xbridge<sup>TM</sup>C18 色谱柱分离, 外标法定量。**结果** 苯并(a)芘在 0~100 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数  $r=0.9994$ 。本方法的测定低限(S/N = 10): 茶油、罗非鱼和猪肉为 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 大米、包菜、茶叶、饮用水和橙汁为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 添加浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时, 回收率范围为 77.3%~93.2%, 变异系数( $n=6$ )为 0.65%~7.18%。**结论** 该方法前处理简单, 分析时间短, 具有良好的灵敏度和准确性, 适用于各类食品中苯并(a)芘的测定。

**关键词:** 苯并(a)芘; 食品; 高效液相色谱-荧光法; 固相萃取

## Determination of benzopyrene in food by solid phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescent detector

WU Min<sup>1\*</sup>, LI Zheng<sup>2</sup>, LI Cui-Yu<sup>1</sup>, YANG Li-Zhong<sup>1</sup>, XU Dun-Ming<sup>1</sup>, ZHOU Yu<sup>1</sup>

(1. Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China;

2. College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**ABSTRACT: Objective** A method of solid phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescent detector(HPLC-FLD)was developed for determination of benzopyrene (BaP) in foodstuffs. **Method** The analytical procedure includes optimization of extraction conditions, purification using a SPE column and separation by Xbridge<sup>TM</sup>C18 Chromatographic column, followed by a quantitative external standard method. **Results** The method showed a good linearity over the range of 0~100 ng/mL for benzopyrene (BaP) with  $r=0.9994$ . The detection limits (S/N = 10) were 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for tea seed oil, tilapia, pork and 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  for rice, cabbage, tea, water and orange juice. The recoveries were 77.3%~93.2% at spiked levels of 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the relative standard deviations were 0.65%~7.18% ( $n=6$ ). **Conclusion** This method has the advantages of easy to operate, fast to perform, with high sensitivity and accuracy, and it was suitable for the detection of benzopyrene in foodstuffs.

**KEY WORDS:** benzopyrene; foodstuffs; HPLC-FLD; solid phase extraction

多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是一类广泛存在于环境中具有“三致作用”(致癌、致畸、致基因突变)的持久性有机污染物(Persistent Organic Pollutants, POPs), 因而受到国际

基金项目: 国家质检总局科研计划资助项目(2012IK192)

\*通讯作者: 吴敏, 高级工程师, 研究方向: 食品有毒有害物质分析。E-mail: shimianhe74@sina.com

科学界的广泛关注<sup>[1,2]</sup>。虽然生物合成、火山活动会产生多环芳烃,但人类活动才是造成多环芳烃污染的主要原因<sup>[3]</sup>。煤碳、石油、天然气等不完全燃烧产生的多环芳烃进入大气<sup>[4]</sup>,随降雨污染水源。水上行驶的船舶漏油、工业废水排放等也是水体多环芳烃的污染源口<sup>[5]</sup>。苯并(a)芘(BaP)是多环芳烃中研究最广泛的一种,它通过食物链在鱼类、植物和软体动物中发生生物蓄积,造成食物污染。有关大气、水体和土壤中苯并(a)芘的检测方法,国内外已有很多报道<sup>[6,7]</sup>。根据检测对象、富集提取方式的不同,使用的分析方法也不相同,主要有薄层层析法<sup>[8]</sup>,荧光分光光度法<sup>[8]</sup>,气相色谱法<sup>[8]</sup>,气相色谱-质谱法<sup>[8]</sup>,高效液相色谱紫外法<sup>[9]</sup>,高效液相色谱荧光法<sup>[10]</sup>,其中荧光法灵敏度高,重现性好,是较常用的方法。目前有关食品中苯并(a)芘的检测报道较少,特别是苯并(a)芘快速检测与鉴定方法。2010年韩国对进口水产品新增检测项目将苯并(a)芘列入其中;2010年检验检疫部门对进口菲律宾毛椰子油进行检测时,发现其苯并(a)芘超标,不符合我国食品卫生标准;2010年8月,国内最大的山茶油生产商-金浩茶油被检出苯并(a)芘超标,严重危害消费者的身体健康。为了满足检验检疫部门对污染物残留监控及食品出口企业对外贸易的需要,建立食品中苯并(a)芘的检测方法迫在眉睫。本文采用固相萃取柱对基质较为复杂的食品样品进行净化处理,有效排除基质干扰,再用高效液相色谱法-荧光检测器(HPLC-FLD)测定,灵敏度高,有利于各类食品中苯并(a)芘的准确快速的定性定量分析。

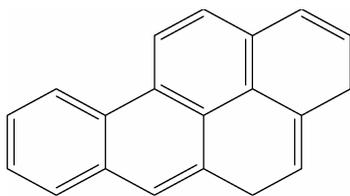


图 1 苯并(a)芘化学结构式

Fig. 1 Chemical structural formula of benzo(a)pyrene (BaP)

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Agilent1200 高效液相色谱仪(安捷伦公司),配荧光检测器;离心机(上海安产科学仪器厂);转速分别不低于 4000 r/min 和 15000 r/min;粉碎机(飞利浦

公司);高速打散机(IKA T25);涡旋混合器;固相萃取装置(美国 Supelco 公司);氮吹仪(美国 Caliper 公司);天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);苯并(a)芘标准品:浓度 12.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,中国计量科学研究院;弗罗里硅土小柱:500 mg/6 mL;C18 固相萃取小柱:200 mg/3 mL;1 mol/L 氢氧化钾乙醇水溶液(乙醇:水=9:1);所用试剂均为分析纯或色谱纯;超纯水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 提取

##### 1.2.1.1 粮食、茶叶、茶粉和咖啡等含水分少的食品

称取 2.0 g 均匀粉碎后样品,加入 10 mL 的超纯水,振荡混匀,静置 5 min,加入 15 mL 的正己烷高速打散均质提取 3 min,置于 4000 r/min 的转速下离心 3 min,取出上清液,再加入 10 mL 的正己烷,同上步操作,将两次离心得到的上清液合并于氮吹仪中,氮吹至近干,用 10 mL 环己烷溶解试样,待净化。

##### 1.2.1.2 植物油、鱼、肉、及其制品

称取 2.0 g 混匀油样或切碎混匀的试样,加入 10 mL 1 mol/L 的氢氧化钾乙醇水溶液均质 2 min,于 65  $^{\circ}\text{C}$  的水浴中皂化 2 h,皂化完毕后,冷却到室温,向样品离心管中加入 10 mL 超纯水,摇匀,再加入 15 mL 正己烷,在涡旋混合器上混匀 2 min,置于 4000 r/min 的转速下,离心 3 min。将上清液移入试管中,向样品离心管中加入 10 mL 的正己烷,同上步操作,将合并的两次提取液于氮吹仪中,氮吹至近干,用 10 mL 环己烷溶解试样,待净化。

##### 1.2.1.3 蔬菜类

称取 2.0 g 绞碎的试样,加入 15 mL 的正己烷均质提取 3 分钟,下同步骤 1.2.1.1。

##### 1.2.1.4 饮料类

吸取 5.0 mL 试样于 50 mL 聚四氟乙烯管中,加入 15 mL 的正己烷均质提取 3 min,下同步骤 1.2.1.1。

#### 1.2.2 净化

采用弗罗里硅土 SPE 小柱净化处理,使用前用 6 mL 环己烷润湿活化,再将 1.2.1 中的浓缩液移入柱中,并收集流出液,再用 10 mL 环己烷淋洗柱子,合并收集到的滤液,浓缩后用 1 mL 乙腈溶解试样,过 0.4  $\mu\text{m}$  的滤膜,上机测定。

### 1.3 液相色谱条件

色谱柱: XbridgeTMC18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,

5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A 为超纯水; 流动相 B 为乙腈, 比例为 A : B=5 : 95; 流速 1.0 mL/min; 进样量 10  $\mu\text{L}$ ; 荧光检测器(FLD), 激发波长(Ex) 289 nm, 发射波长(Em) 432 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取溶剂的选择

目前文献中报道的 3, 4-苯并(a)芘的提取剂种类很多, 有研究表明, 用苯作为提取剂效果最好, 但从安全角度考虑, 本文采用石油醚、正己烷、环己烷和氯仿为提取剂, 分别优化不同基质的提取条件, 通过计算回收率比较四种提取剂的提取效果, 见表 1。

加标回收率试验发现正己烷和环己烷提取效果最好, 回收率达到了 93.2%和 90.2%, 石油醚和氯仿不理想, 但环己烷提取时会与皂化的甘油脂肪酸涡旋后乳化, 所以选用正己烷作为 3, 4-苯并(a)芘提取试剂。

对于鱼类样品, 苯并芘(a)不仅存在于脂肪组织中, 还扩散到肌肉组织中; 对于油脂样品, 用正己烷作为提取剂, 提取出来的油脂等比较多, 苯并芘在碱性条件下很稳定, 所以本文采用了先对样品基质进行皂化, 除去油脂类杂质, 然后用正己烷进行萃取。

表 1 不同提取剂对提取效果的影响

Table 1 Effect of different extraction solvents on extraction efficiency

Solvent	Addition (ng/kg)	Recovery (% , n 6)
petroleum ether	1.0	52.1
	10.0	62.5
	100	63.2
n-hexane	1.0	76.5
	10.0	83.4
	100	93.2
cyclohexane	1.0	75.9
	10.0	84.8
	100	90.2
chloroform	1.0	46.6
	10.0	59.7
	100	68.7

### 2.2 皂化条件的选择

以茶油为基质、回收率为考察指标, 分别优化了皂化时间和皂化温度, 时间和温度对回收率的影响分别见图 2、图 3。从图 2 可以看出, 皂化时间短, 皂化不完全, 回收率偏低; 皂化时间超过 2 h, 皂化时间对回收率贡献不大, 甚至因为乳化造成回收率过高, 所以皂化时间为 2 h 适合。从图 3 可以看出, 皂化温度过低, 皂化不完全, 回收率偏低, 皂化反应是放热反应, 皂化温度过高也会造成放热不完全, 产生沉淀, 回收率也偏低, 皂化温度 65  $^{\circ}\text{C}$  最适合。

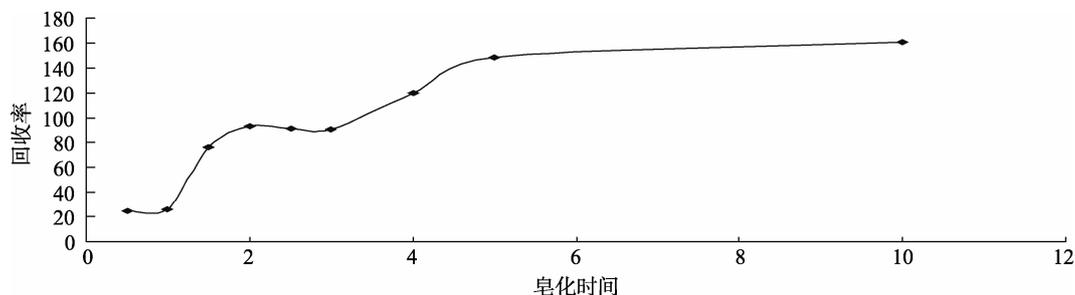


图 2 皂化时间对回收率的影响(/h)

Fig. 2 Effect of saponification time on recovery

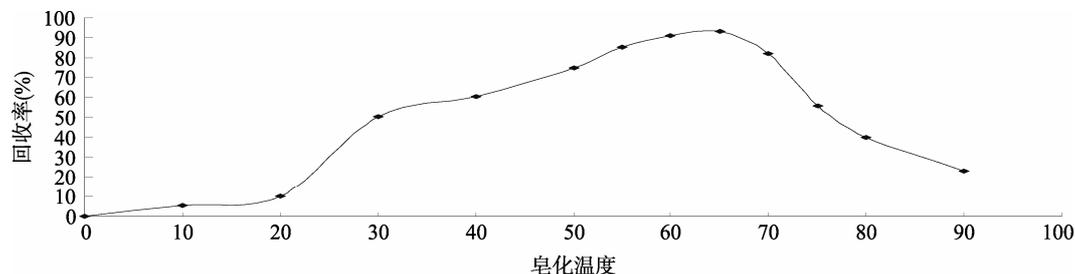


图 3 皂化温度对回收率的影响(/h)

Fig. 3 Effect of saponification temperature on recovery

### 2.3 净化条件的选择

弗罗里硅土是高选择性的吸附剂, 在正相条件下能够从非极性基质中强烈吸附极性分析物。采用 Florisil SPE 小柱萃取样品, 可以显著降低基质中极性化合物对分析物的干扰。由于动植物组织中共萃物具有一定的极性, 一般选用弱极性的淋洗液, 淋洗液极性越低, 共萃干扰物淋洗出来的越少, 净化效果越好, 加之 Florisil 对亲脂性化合物有特别的吸附作用, 很适于油性食品的净化, 用低极性溶剂洗脱 Florisil

柱, 非极性物质的回收率较高。所以本实验采用环己烷作为洗脱剂, 回收效果良好。以下是样品未净化(图 4)和净化过柱(图 5)的色谱图。

另外我们还对比了 C18 固相萃取小柱, 使用前用甲醇和水分别活化柱子, 样品提取液浓缩后用甲醇水(1:1 体积比)溶解上样, 正己烷洗脱, 也取得很好的净化效果和 90%的回收率。以下是使用 C18 固相萃取柱样品未净化(图 6)和净化过柱(图 7)的色谱图。

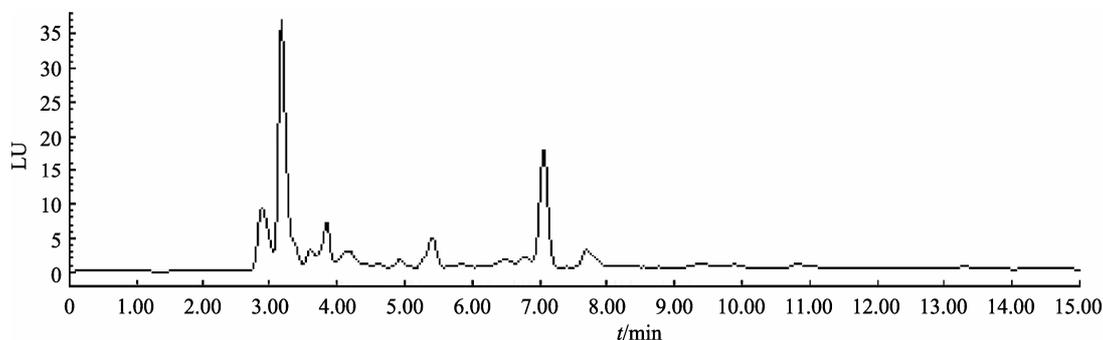


图 4 未净化样品色谱图

Fig. 4 Chromatogram of unpurified sample

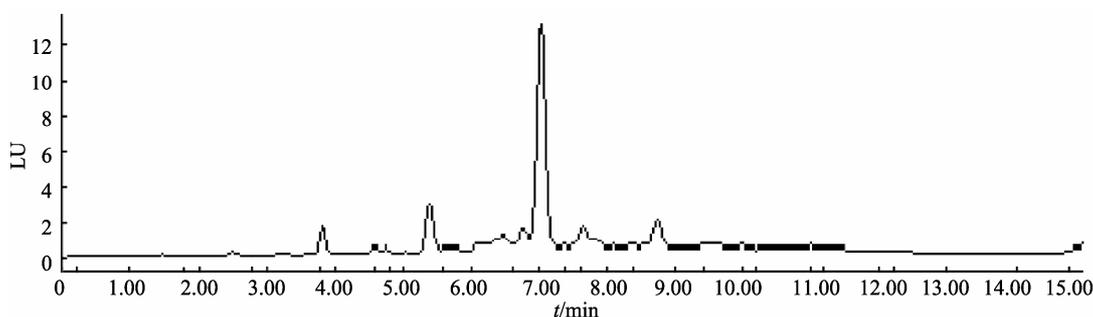


图 5 Florisil SPE 小柱净化过柱后的样品色谱图

Fig. 5 Chromatogram of purified sample with Florisil SPE column

FLD1 A. Ex=289. Em=432 (PAHS\???\2012.03.22 22.22.02\20120322000005.D)

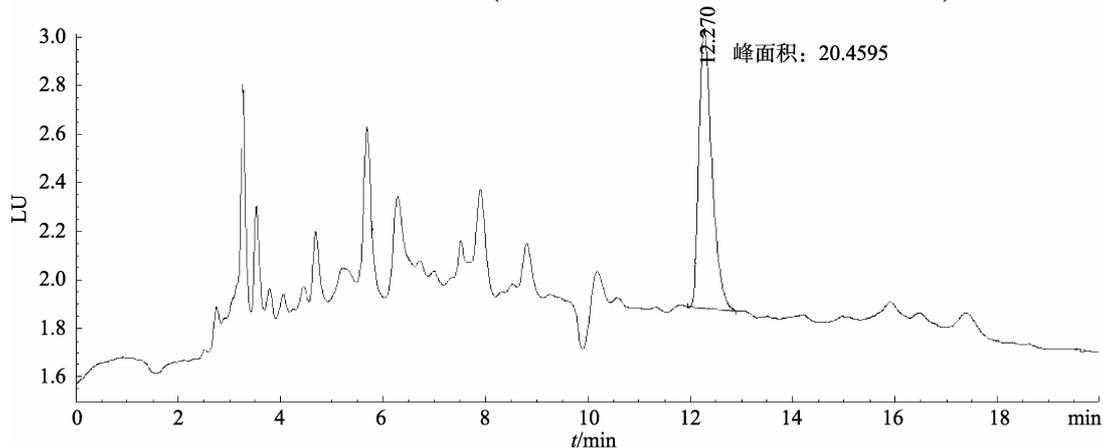


图 6 未净化的样品色谱图

Fig. 6 Chromatogram of unpurified sample

FLD1 A. Ex=289. Em=432 (PAHS\??2012-03-22 15-01-41\20120322000012.D)

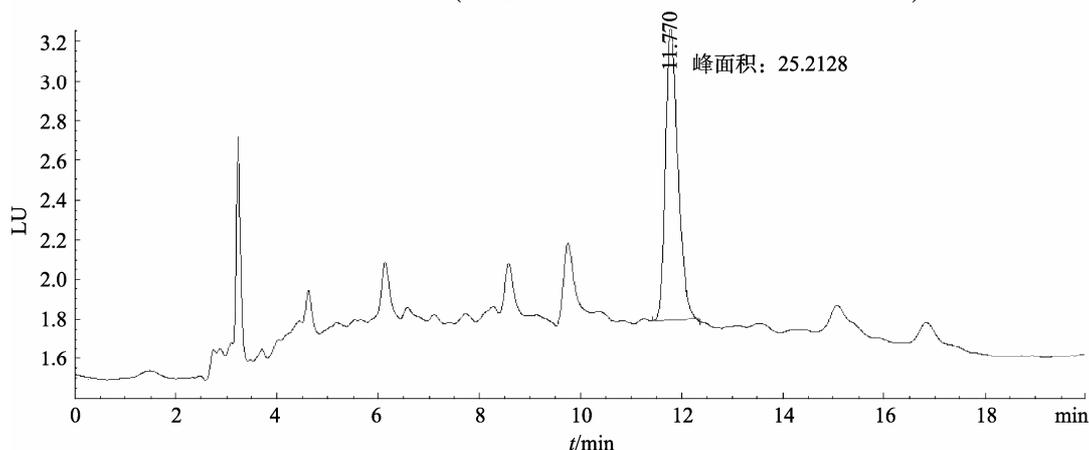


图7 C18 SPE 净化后的样品色谱图

Fig. 7 Chromatogram of purified sample with C18 SPE column

但是考虑到弗罗里硅土固相萃取柱具有更好的选择性和针对性,所以试验采用弗罗里硅土柱净化样品提取液。

#### 2.4 流动相的确定

试验比较了不同比例的乙腈与水作流动相的效果,试验发现,乙腈的比例对目标物出峰时间影响比较大,乙腈比例较大时,洗脱能力较强,可以缩短B(a)P的保留时间,但此时样品中其它杂质会发生重叠;减小乙腈比例,可以改善样品溶液中各个色谱峰的分离度,却B(a)P的保留时间延长,操作费时。经试验得出当V(乙腈):V(水)=95:5,流速为1.0 mL/min时,B(a)P出峰时间合适,峰形较好并能与基体杂质分开,见图8和图9。

#### 2.5 检测波长的确定

将苯并芘用流动相溶解后,测定其最大激发波长(Ex)和发射波长(Em),分别为283 nm,404 nm,因

此选择Ex 283 nm,Em 404 nm。该色谱条件下的苯并(a)芘的液相色谱图见图10。

#### 2.6 方法的线性范围、定量下限、回收率和精密度

在0~100 ng/mL浓度范围内,以峰面积(Y)与苯并芘浓度(X, ng/mL)绘制标准工作曲线。结果表明,在0~100 ng/mL质量浓度范围内,苯并(a)芘呈良好线性关系,线性方程 $Y=134.179X-20.018$ ,相关系数(r)为0.9994,茶油、罗非鱼和猪肉的定量下限(S/N 10)为1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,大米、包菜、茶叶、饮用水和橙汁为0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

在最优的实验条件下,按照上述色谱条件对各类食品样品进行加标回收率实验,苯并(a)芘的加标水平选为0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,每个水平进行大于6次平行实验,各加标水平的回收率和精密度见表1。结果表明,添加浓度0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率范围77.3%~93.2%,变异系数0.65%~7.18%。

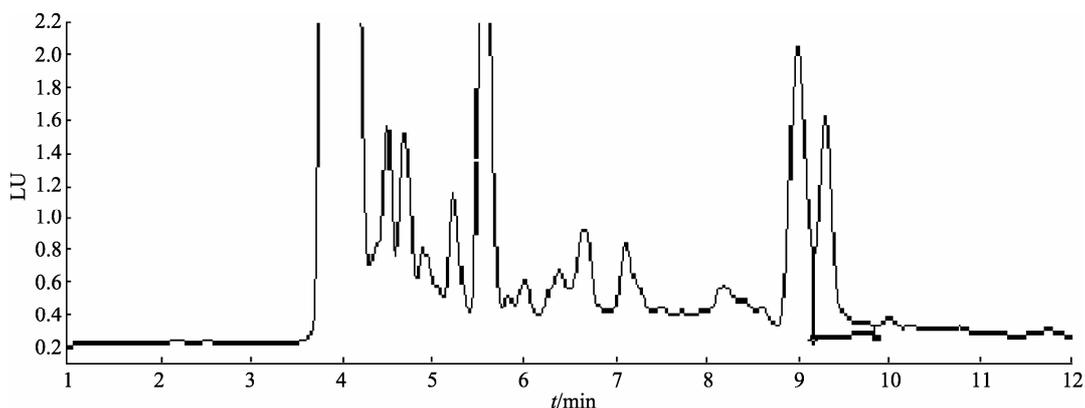


图8 流动相优化前色谱图

Fig. 8 Chromatograms of of the mobile phase before the optimization

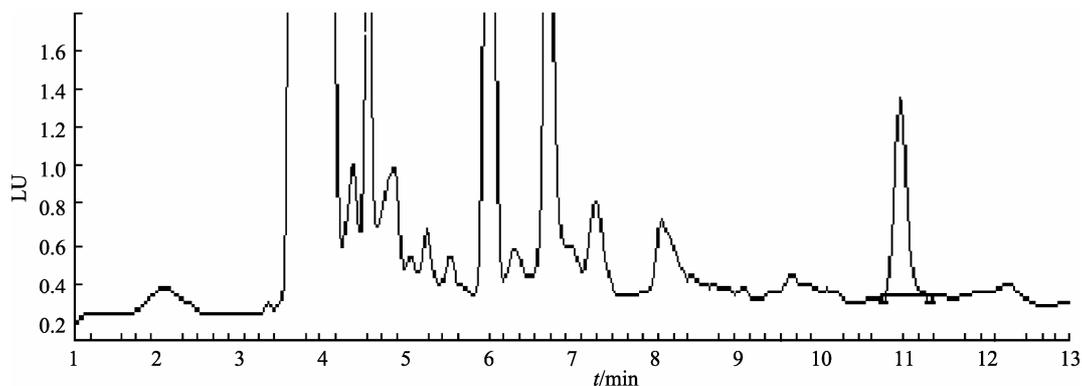


图 9 流动相优化后色谱图

Fig. 9 Chromatograms of the mobile phase after the optimization

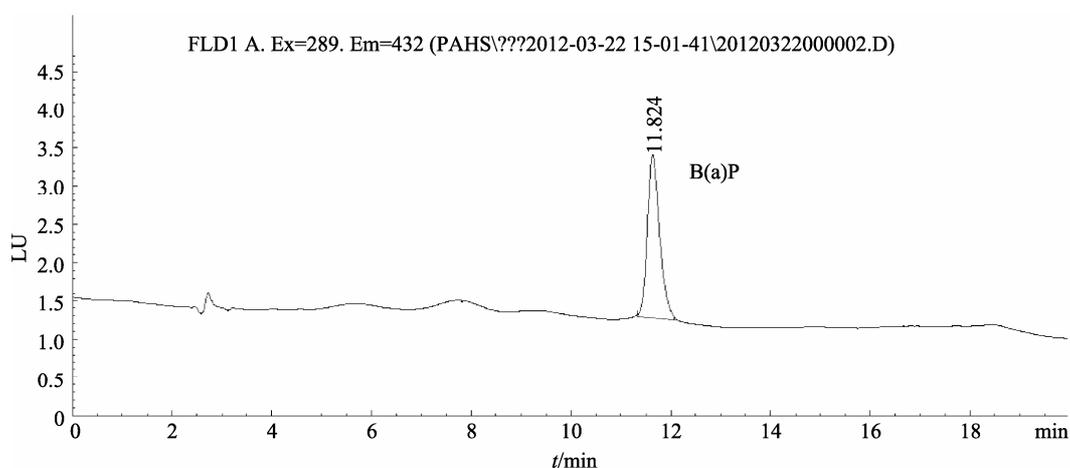


图 10 10 ng/mL 苯并(a)芘标液的液相色谱图

Fig. 10 Chromatogram of benzopyrene(BaP)standard solution

表 2 不同食品样品中苯并(a)芘的加标回收率和相对标准偏差( $n \geq 6$ )Table 2 Recoveries and RSD of benzopyrene (BaP) in different kinds of food ( $n \geq 6$ )

Sample	Addition ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)	RSD (%)
tea seed oil	1.0, 10, 100	89.0, 93.2, 87.3	3.15, 0.97, 3.37
tilapia	1.0, 10, 100	92.0, 81.8, 90.2	2.72, 3.32, 1.12
pork	1.0, 10, 100	81.0, 85.6, 83.2	6.15, 1.83, 0.65
rice	0.5, 10, 100	86.0, 82.4, 88.6	5.26, 3.20, 2.16
cabbage	0.5, 10, 100	78.0, 79.2, 77.3	4.15, 2.63, 3.85
tea	0.5, 10, 100	92.0, 85.2, 94.4	6.32, 4.17, 5.33
orange juice	0.5, 10, 100	90.0, 91.8, 85.0	7.18, 5.15, 1.02
water	0.5, 10, 100	91.2, 92.5, 90.3	5.12, 3.24, 2.06

## 2.7 实际样品的测定

应用本方法对市购的茶油、罗非鱼、猪肉、大米、包菜、茶叶、饮用水和橙汁进行苯并(a)芘含量的测定, 茶油中均检出苯并(a)芘, 含量为 1.2~8.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 其余样品均未检出苯并(a)芘。另外还对委托本局检测苯并(a)芘的回锅油样品按照该优化的方法进行检

验, 检出其中苯并(a)芘的含量为  $<1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 因此以苯并(a)芘为判定指标来定性地沟油是不可信的。

## 3 结 论

饮用水、植物源性食品样品基质干净, 前处理较简单, 而动物源性样品中基质成分复杂, 可溶性蛋白

质种类繁多,前处理不好直接影响检测结果的判定。本研究中样品经皂化,再经 Florisil 固相萃取柱净化,有效排除了杂峰对目标峰的干扰,得到的色谱图背景干净,色谱峰形好。该法样品预处理简单,分离效果好,且准确性和重复性好,满足于检测机构用于食品中苯并芘(a)含量的测定,各项技术指标均符合检测要求。

#### 参考文献

- [1] Simpson CD, Mosi AA, Cullen WR, *et al.* Composition and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in surficial marine sediments from Kitimat Harbor, Canada [J]. *Sci Total Environ*, 1996, 181: 265-278.
- [2] Sun P, Weavers LK, Taerakul P, *et al.* Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on lime spray dryer (LSD) ash using different extraction methods [J]. *Chemosphere*, 2006, 62(2): 265-274.
- [3] 袁彦华, 孙连军, 郭秀兰, 等. 多环芳烃化合物环境污染研究 [J]. *环境与健康杂志*, 1999, 16(3): 182.
- [4] 王肇慈. 粮油食品卫生检测(2版) [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2001: 407.
- [5] 汤根土, 盛国英, 傅家谟, 等. 有机污染源标志物的探讨及其

研究意义[J]. *中国环境科学*, 1996, 16(3): 223.

- [6] Fahrnieh KA, Pravda M, Guibault GG. Recent applications of electrogenerated chemiluminescence in chemical analysis [J]. *Talanta*, 2001, 54(4): 531.
- [7] Tao S, Cui Y, Cao JA. Determination of PAHs in wastewater irrigated agricultural soil using GC/MS [J]. *J Environ Sci Health, Part B*, 2002, 37(2): 141.
- [8] 赵月兰, 秦建华. 苯并芘对动物性食品的污染与检测[J]. *中国动物检疫*, 1996, 13(2): 15.
- [9] 阎吉昌, 徐书绅, 张兰英. 环境分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 318.
- [10] 李先国, 阎国芳, 周晓等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定海水中的多环芳烃[J]. *中国海洋大学学报*, 2009, 39(5): 1087-1092

(责任编辑: 孙媛媛)

#### 作者简介



吴敏, 高级工程师, 研究方向: 食品有毒有害物质分析。

E-mail: shimianhe74@sina.com

## “新资源食品”专题约稿函

“新资源食品”是指在我国新研制、新发现、新引进的无食用习惯的,符合食品基本要求的物品称。卫生部目前批准了二十几项新资源食品,例如:仙人掌、金花茶、芦荟、双歧杆菌、嗜酸乳杆菌等。由于新资源食品的重要营养价值,其研发、利用越来越得到重视。

鉴于此,本刊特别策划了“新资源食品”专题,围绕新资源的功能、开发、应用、安全质量控制等的相关技术和方法等问题展开讨论,计划在2012年下半年出版。编辑部特向各位专家诚征惠稿,综述、研究论文均可,以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在8月15日前通过网站或Email投稿。我们将快速处理并优先发表专题论文。

#### 投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [tougao@chinafoodj.com](mailto:tougao@chinafoodj.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部