

液相色谱法测定奶油中苯并(a)芘的研究

吴 腾*, 崔向云, 扎木则仁, 魏文平, 常建军, 宋晓东, 高永亮

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘 要: **目的** 建立液相色谱法检测奶油中苯并(a)芘的快速检测方法。**方法** 试样中的苯并(a)芘经正己烷溶解提取, 通过苯并(a)芘专用 SPE 小柱分离纯化, 液相色谱-配荧光检测器检测, 通过保留时间定性、外标法定量。**结果** 该方法检测苯并芘回收率范围在 88.4%~98.7%之间, 相对标准偏差在 1.23%~3.22%之间, 最低检出限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法简单、快速、分离度好, 适用于批量样品的测定。

关键词: 苯并(a)芘; 奶油; 高效液相色谱法; 荧光检测器

Determination of benzo(a)pyrene in cream by liquid chromatography

WU Teng*, CUI Xiang-Yun, ZHAMU Ze-Ren, WEI Wen-Ping, CHANG Jian-Jun,
SONG Xiao-Dong, GAO Yong-Liang

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co., Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: **Objective** To develop a method for determination of benzo(a)pyrene content in cream by liquid chromatography. **Methods** Samples were dissolved by n-hexane, and then separated and purified by benzo(a)pyrene SPE column. The extracts were detected by high performance liquid chromatography with fluorescence detector, qualitative and quantification analyses were achieved by retention time and external standard method with peak area, respectively. **Results** The recoveries of benzo(a)pyrene were ranged of 88.4%~98.7%, the relative standard deviation were 1.23%~3.22%, and the detection limit was 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This method is simple and rapid, with a good separating degree, which is suitable for the bath sample determination.

KEY WORDS: benzo(a)pyrene; cream; high performance liquid chromatography; fluorescence detector

1 引 言

苯并(a)芘又称 3,4-苯并芘, 属于多环芳烃类(PAHs), 是一种常见的高活性间接致癌物^[1]。近年来, 我国出口欧盟和韩国等国家的植物油中多次检测出苯并(a)芘含量超标, 2010 年“金浩”茶油的超标事件再次敲响食用油安全的警钟^[2]。苯并(a)芘可引发肺癌、胃癌、膀胱癌及消化道癌等多种癌症^[3,4]。苯并(a)芘还具有致畸性和致突变性, 能通过母体经胚胎影响子代, 从而引起胚胎畸形或死亡以及幼仔免疫功能下降^[5,6]。

目前, 苯并(a)芘的检测方法有荧光分光光度计法^[7]、液相色谱-荧光检测器法^[8-12]、液相色谱-紫外检测器法^[13,14]、紫外分光光度计法^[15]、气相色谱串联质谱法^[16]等。GB/T 22509-2008《动植物油脂苯并芘的测定反相高效液相色谱法》, 采用去活性的中性氧化铝层析柱进行前处理, 该方法对油脂的去除效果有限, 称样量不能大于 0.4 g, 否则不能有效去除油脂, 而且溶剂消耗量较多、耗时长、方法较繁琐。本研究采用苯并芘专用 SPE 小柱, 目标物能够在该柱上很好保留, 而且操作简便、快速、成本较低, 克服了国标方法的缺点。

*通讯作者: 吴腾, 初级工程师, 主要研究方向为食品仪器分析检测。E-mail: wuteng@mengniu.cn

*Corresponding author: WU Teng, Junior Engineer, Inner Mongolia Dairy Industrial Co., Ltd., Hohhot 011500, China. E-mail: wuteng@mengniu.cn

2 材料与方法

2.1 试剂

苯并芘标准品 (≥ 99.0%, DR. Ehrenstorfer GmbH); 正己烷(色谱纯, 天津福晨化学试剂厂); 二氯甲烷(色谱纯, 天津福晨化学试剂厂)。

苯并芘专用 SPE 柱(500 mg/6 mL, 天津博纳艾杰尔科技有限公司); 硅胶柱(500 mg/6 mL, 天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

以上试剂, 除特殊注明外均为分析纯试剂, 水为符合 GB/T 6682 规定的一级水

2.2 仪器与设备

U3000 型液相色谱仪(配荧光检测器, 美国戴安公司); 梅特勒天平(万分之一天平, 十万分之一天平, 瑞士梅特勒-托利多公司); MS3 basic 型漩涡混合器(德国 IKA 公司); 固相萃取装置(Agela); 氮吹仪(Organomation Associates, Inc)。

2.3 标准溶液配制

苯并芘标准储备液: 准确称取适量的苯并芘标准品, 用正己烷配制成浓度为 0.01 mg/mL 的标准储备液溶。4℃避光保存, 有效期为 6 个月;

苯并芘标准工作液: 用苯并芘标准储备溶液配制浓度为 0.01 μg/mL 的标准工作液 4℃避光保存, 有效期为 6 个月。

2.4 实验方法

2.4.1 样品预处理

称取混合均匀的试样约 0.4 g(精确到 0.1 mg)于 50 mL 离心管中, 加入 3 mL 正己烷涡旋溶解, 作为待净化液。

2.4.2 SPE 净化过程

由于奶油基质中含有部分水分, 直接上样会影响净化效果。需要在苯并芘专用柱上串联硅胶固相萃取柱, 固相萃取方法如下:

活化: 先加入 5 mL 二氯甲烷, 待溶液流完后再

加入 5 mL 正己烷。

上样: 将待净化液上样到 SPE 柱上, 然后再用 3 mL 正己烷润洗离心管, 将润洗液上样到柱上。

淋洗: 取 5 mL 正己烷淋洗串联柱, 待溶液完全滴至苯并芘专用柱中, 将硅胶柱弃去, 再取 5 mL 正己烷淋洗苯并芘专用柱, 弃去淋洗液。

洗脱: 5 mL 二氯甲烷, 收集于试管中。

浓缩: 将洗脱液在 40℃下氮气吹干, 用 1 mL 正己烷定容, 涡旋溶解, 过 0.22 μm 有机滤头, 收集于 2 mL 进样瓶中, 待测。

2.4.3 结果计算

试样中苯并(a)芘的含量 X(μg/kg):

$$X = \frac{A \times C_s \times V}{A_s \times m} \times 1000$$

式中:

- X: 试样中苯并芘的含量, μg/kg;
- A: 试样的峰面积;
- C_s: 标准溶液的浓度, μg/mL;
- V: 试样定容体积, mL;
- A_s: 标准溶液的峰面积;
- m: 试样质量, g。

2.5 色谱条件

色谱柱: 艾杰尔 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)或相当者; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 乙腈:水=88:12; 进样量: 20 μL; 柱温: 30℃; 发射波长: 406 nm; 激发波长: 384 nm。

备注: 以上仪器条件是参考条件, 在实际操作过程中可以根据样品特性和仪器状态做适当调整。

3 结果与讨论

3.1 准确度和精密度

在奶油样品中加入 3 个浓度水平的双甲脒进行加标回收率试验, 回收率范围在 88.4%~98.7%之间、RSD 范围在 1.23%~3.22%之间; 见表 1。

表 1 样品的准确度和精密度分析(n=6)
Table 1 Results of accuracy and precision test (n=6)

样品名称	加标量(μg/kg)	平均结果(μg/kg)	回收率(%)	RSD(%)
奶油	2.5	2.32	88.4~96.4	3.22
	5.0	4.83	95.6~98.6	1.23
	10.0	9.69	94.8~98.7	1.58

3.2 检出限

使用 20 次空白基质样品进行检出限验证($S/N>3$), 检出限计算公式:

$$XL=X_b+K\times S_b$$

式中: X_b ——空白多次测得信号的平均值;
 S_b ——空白多次测得信号的标准偏差;
 K ——根据一定置信水平确定的系数。

当 $K=3$ 时, XL 对应的样品浓度即为 90%置信度的方法检出限($LOD_{90\%}$)按以上公式计算得到的检出限为 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.3 讨 论

由于奶油基质中含有部分水分, 直接上样会影响净化效果, 而且回收率与精密度都达不到要求, 所以, 需要在苯并芘专用柱上串联硅胶固相萃取柱。

当流动相为乙腈-水(88:12, V:V)时, 苯并(a)芘色谱峰与杂质峰能获得良好的峰型和分离度, 因此, 选用乙腈-水(88:12, V:V)作为检测苯并(a)芘的流动相。

3.4 相关图谱

标准溶液色谱图、本底样品色谱图、加标样品色谱图如下:

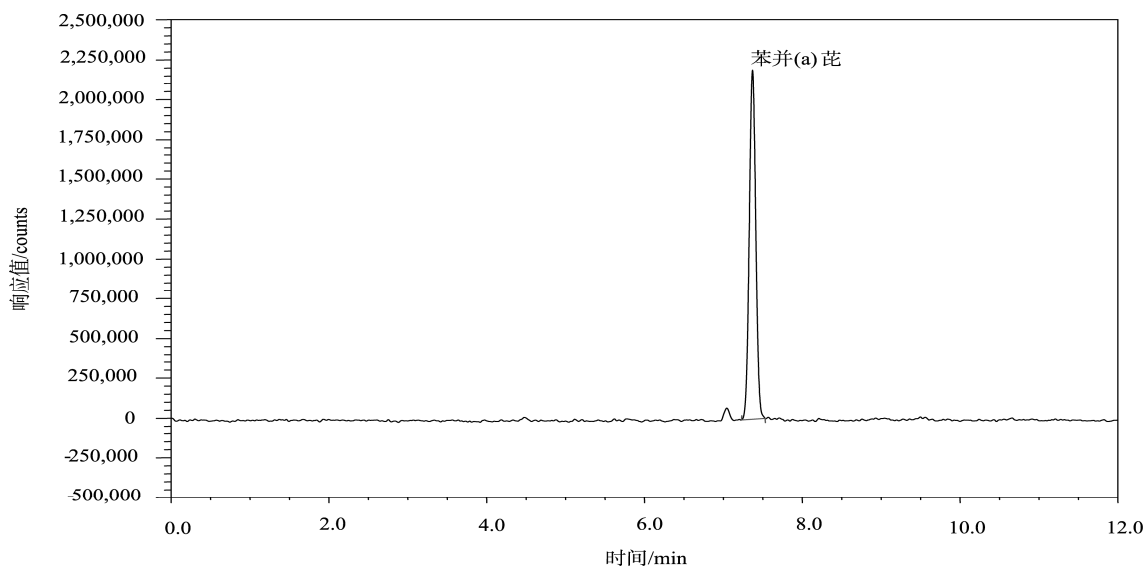


图 1 标准溶液色谱图
Fig. 1 Chromatogram of standard solution

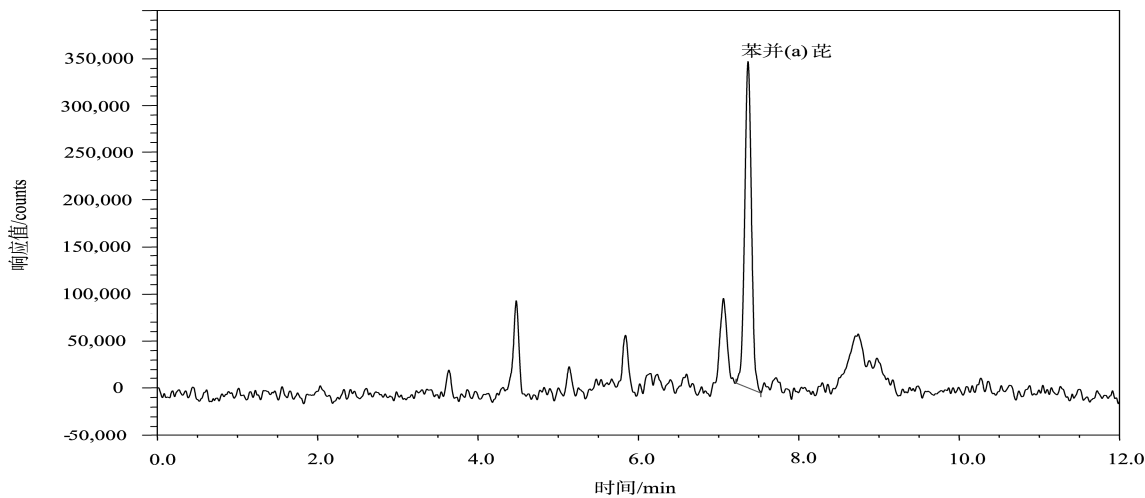


图 2 本底样品色谱图
Fig. 2 Chromatogram of background sample

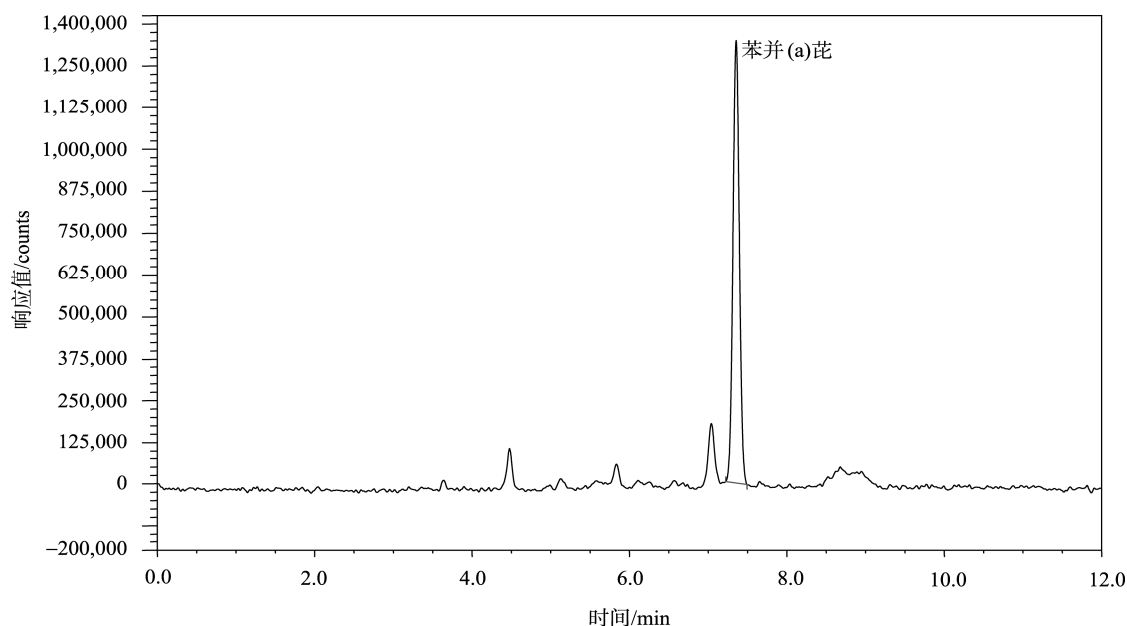


图3 加标样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of spiked sample

4 结论

本研究建立了一种奶油中 Bap 检测的液相色谱方法。该方法前处理简单、重复性好、分析时间短,检出限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率范围为 88.4%~98.7%, RSD 范围为 1.23%~3.22%, 能较好的满足奶油中 Bap 的快速检测需求。

参考文献

- [1] 王丹, 曹维强, 王静. 食品安全隐患-苯并(a)芘的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 132-135.
Wang D, Cao WQ, Wang J. Food safety problems-of benzo(a)pyrene research progress [J]. Food Res Devel, 2006, 27(1): 132-135.
- [2] 李进伟, 王兴国, 金青哲. 食用油中苯并(a)芘的来源、检测和控制[J]. 中国油脂, 2011, 36(6): 7-11.
Li JW, Wang XG, Jin QZ. The source of the oils benzo(a)pyrene, detection and control [J]. Oil China, 2011, 36(6): 7-11.
- [3] Qiu CY, Peng B, Cheng SQ, *et al.* The effect of occupational exposure to benzo(a)pyrene on neurobehavioral function in coke oven workers [J]. Am J Ind Med, 2013, 56(3): 347-355.
- [4] Galvez-Peralta M, Shi ZQ, Chen J, *et al.* Oral benzo(a)pyrene in cyplal1bl(-/-) double-knockout mice: microarray analysis during squamous cell carcinoma formation in preneoplastic gland duct [J]. Int J Cancer, 2013, 132(9): 2065-2075.
- [5] Zalacain M, Sierrasesumaga L, Larannaga C, *et al.* Effects of benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE) *in vitro* and of maternal smoking *in vivo* on micronuclei frequencies in fetal cord blood [J]. Pediatr Res, 2006, 60(2): 180-184.
- [6] Zhang TS, Jiang SY, He C, *et al.* Black soybean seed coat polyphenols prevent B(a)P-induced DNA damage through modulating drug-metabolizing enzymes in HepG2 cells and ICR mice [J]. Graduate School Agric Sci, 2013, 752(1-2): 34-41.
- [7] GB/T 5009.27-2003 食品中苯并(a)芘的测定[S].
GB/T 5009.27-2003 The determination of benzo(a)pyrene in food [S].
- [8] GB/T 22509-2008 动植物油脂苯并(a)芘的测定反相高效液相色谱法[S].
GB/T 22509-2008 Animal and vegetable fats oil-determination of benzo(a)pyrene reverse-phase high performance liquid chromatography method [S].
- [9] 杨红梅, 王浩, 刘艳琴, 等. 高效液相色谱法测定肉类食品中苯并芘残留的研究[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(10): 124-126.
Yang HM, Wang H, Liu YQ, *et al.* High performance liquid chromatography determination of benzo(a)pyrene residues in meat food research [J]. Food Res Devel, 2006, 27 (10): 124-126.
- [10] 王春华, 洪抒, 董丽波, 等. 高效液相色谱测定沥青烟雾中

- 3,4-苯并芘[J]. 环境与职业医学, 2007, 24(4): 443-445.
- Wang CF, Hong S, Dong LB, *et al.* High performance liquid spectrometry determination of benzo(a)pyrene in asphalt smoke [J]. Environ Occup Med, 2007, 24(4): 443-445.
- [11] SC/T 3041-2008 水产品中苯并(a)芘的测定高效液相色谱法 [S].
- SC/T 3041-2008 The development of benzo(a)pyrene aquatic products high liquid phase spectrum method [S].
- [12] NY/T 1666-2008 肉制品中苯并(a)芘的测定高效液相色谱法 [S].
- NY/T 1666-2008 The determination of benzo(a)pyrene in meat products high liquid phase spectrum method [S].
- [13] 田晓玲, 柏云江. 高效液相色谱法测定饲料中的苯并(a)芘[J]. 饲料工业, 2005, 26(1): 53-54.
- Tian XL, Bo YJ. High performance liquid spectrometry determination of benzo(a)pyrene in feed [J]. Feed Ind, 2005, 26(1): 53-54.
- [14] NY/T 919-2004 饲料中苯并(a)芘的测定高效液相色谱法[S].
- NY/T 919-2004 The determination of benzo(a)pyrene in feed liquid phase spectrum method [S].
- [15] 齐邦峰, 张会成, 陈立仁, 等. 萃取-紫外分光光度法测定微晶蜡 3,4-苯并芘含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2003, 9(3): 169-172.
- Qi BF, Zhang HC, Chen LR, *et al.* Extraction-ultraviolet spectrophotometry benzo(a)pyrene microcrystalline wax content [J]. Anal Tec Instru, 2003, 9(3): 169-172.
- [16] 何智慧, 罗嘉, 蒋腊梅, 等. 气相色谱-质谱法检测卷烟烟气中的苯并(a)芘[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2007, 19(2): 46-48.
- He ZH, Luo J, Jiang LM, *et al.* Gas chromatography-mass spectrometry detection benzo(a)-pyrene in cigarette smoke [J]. J Hunan Liberal Arts Coll (Nat Sci Edit), 2007, 19(2): 46-48.
- (责任编辑: 李振飞)

作者简介



吴 腾, 初级工程师, 主要研究方向
为食品仪器分析检测。
E-mail: wuteng@mengniu.cn