

高效液相色谱法测定食用植物油中 苯并(a)芘的研究

王桂苓*

(安徽省阜阳市产品质量监督检验所, 国家再生有色金属橡塑材料质量监督检验中心, 阜阳 236000)

摘要: **目的** 建立食用植物油中苯并(a)芘的固相萃取-高效液相色谱荧光检测器测定方法。**方法** 样品以正己烷溶解, 用3种不同苯并(a)芘专用固相萃取柱进行样品净化, 经 Waters PAH C18 色谱柱分离后, 用高效液相色谱荧光检测器测定, 峰面积外标法定量食用植物油中苯并(a)芘含量。**结果** 苯并(a)芘浓度在 0~38.5 ng/mL 范围内, 浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系, 线性相关系数为 0.9998, 检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。在添加量为 5.5~11.0.0 $\mu\text{g/kg}$ 时, 经 3 种 BaP 专用 SPE 小柱处理的回收率均在 91.7%~109.2%之间, 测定结果的相对标准偏差为 2.84%~3.26%($n=6$)。**结论** 以上几种处理方法均适用于食用植物油中苯并(a)芘的日常检测, 但总体讲小柱③的实用性更强, 并有更好的应用前景。

关键词: 苯并(a)芘; 固相萃取; 高效液相色谱; 食用植物油

Determination of benzo(a)pyrene in edible vegetable oil by high performance liquid chromatography

WANG Gui-Ling*

(Fuyang Institute of Product Quality Supervision and Inspection, National Recycle Nonferrous Metals Rubber & Plastic Materials Quality Supervision and Inspection Center, Fuyang 236000, China)

ABSTRACT: Objective A high performance liquid chromatography (HPLC) was developed for the determination of benzo(a)pyrene (BaP) in edible oil. **Methods** The sample was dissolved and extracted by hexane, and then purified by 3 different kinds of cleanert BaP solid phase extraction (SPE) cartridge, respectively. The HPLC separation was performed on a Waters PAH C18 column with acetonitrile and water as mobile phase. The BaP was determined by fluorescence detection, and quantified by the peak area external standard method. **Results** A good linearity was obtained in the range of 0~38.5 ng/mL for BaP with the correlation coefficient was 0.9998. The limit of detection (LOD) was 0.1 $\mu\text{g/kg}$ for BaP in edible oil. When spiked with 5.5~11.0.0 $\mu\text{g/kg}$, the recoveries of BaP purified by 3 different kinds of cleanert BaP-SPE cartridge ranged from 91.7% to 109.2%. The relative standard deviation (RSD) was 2.84%~3.26% ($n=6$). **Conclusion** The above treatment methods can be used for the routine analysis of BaP in edible oil. But on the whole, the practicability of the cleanert BaP-SPE cartridges③ was better, which has a good application prospect.

KEY WORDS: benzo(a)pyrene; solid phase extraction; high performance liquid chromatography; edible vegetable oil

基金项目: 安徽省质量技术监督局科技计划(13zj370029)

Fund: Supported by Anhui Bureau of Quality and Technical Supervision science and technology program (13zj370029)

*通讯作者: 王桂苓, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangguiling0536@126.com

*Corresponding author: WANG Gui-Ling, Master, Engineer, Fuyang Institute of Product Quality Supervision and Inspection, National Recycle Nonferrous Metals Rubber & Plastic Materials Quality Supervision and Inspection Center, No.2009, Huaihe Road, Yingzhou District of Fuyang City, Fuyang 236112, China. E-mail: wangguiling0536@126.com

1 引言

苯并(a)芘(benzo(a)pyrene, BaP)又称 3, 4-苯并芘, 是一种公认高活性强致癌有机化合物^[1-5]。苯并芘广泛存在于空气、水、土壤中, 是多环芳烃中毒性最大的一种强烈致癌物, 是世界三大强致癌物(黄曲霉、苯并芘、亚硝胺)之一^[6,7]。食用植物油中苯并芘的主要来源包括: 油料作物在种植晾晒过程中可能受到环境中的苯并芘污染, 在加工生产过程中浸出阶段温度过高可能产生苯并芘, 在油料焙烤时也可能产生苯并芘, 在运输和储存过程中受到容器或环境中苯并芘污染^[3-8]。欧盟标准规定食用油中苯并(a)芘含量的上限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 我国《食用植物油卫生标准》中规定为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[9,10]。苯并芘的分析方法有荧光分析法^[11]、气相色谱法^[12]、气相色谱-质谱联用法^[13,14]、薄层法^[15]和液相色谱法^[16-18]等。2008 年国家质量监督检验检疫总局与国家标准化委员会共同发布国家标准 GB/T 22509-2008^[19], 采用的是填充氧化铝柱的净化方法, 操作繁琐复杂。本文以食用植物油为研究对象, 采用正己烷溶解提取样品中的 BaP, 分别用 3 种 BaP 专用固相萃取柱净化处理, 进行液相色谱-荧光检测器测定比较。3 种 BaP 专用 SPE 小柱进行样品前处理, 虽然处理方法有简单有复杂, 对样品的净化效果不同, 但 BaP 的峰型均较好、分离度好, 均能对 BaP 进行较好的定性和定量, 线性范围广、灵敏度高, 并且具有很好的重现性和精密度, 均适合食用植物油中 BaP 的分析检测。在食用植物油中 BaP 的日常检测工作中, 可根据样品的实际需求采用以上不同的处理方法。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

液相色谱仪(L-2000 型, 配荧光检测器(FLD), 日本日立高新技术公司); 漩涡混匀器(XW-80A 型, 上海精科实业有限公司); 固相萃取装置(HSE, 天津市恒奥科技发展有限公司); 旋转蒸发仪(Rotavapor R-3, 上海申胜生物技术有限公司); 氮吹仪(N-EVAP111, 上海安谱科学仪器有限公司); BaP 专用 SPE 小柱(①ProElut BaP, 22 g, 60 mL, 迪马科技有限公司; ②Cleanert BaP-SPE, 22 g, 60 mL, 上海安谱科学仪器有限公司; ③BaP-SPE Cartridge, 500 mg, 6 mL, 上海

安谱科学仪器有限公司); 己烷、乙腈(色谱纯, 上海安谱科学仪器有限公司)、四氢呋喃(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); BaP 标准物质(纯度 $\geq 98\%$, Dr.Ehrenstorfer GmbH)。实验用水为屈臣氏蒸馏水。

2.2 色谱条件

色谱柱: Waters PAH C₁₈(5 μm)(250 mmL $\times$ 4.6 mmI.D.); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈 + 水 = 900 + 100(体积比); 流速: 1.000 mL/min; 荧光检测器: 激发波长(Ex)384 nm, 发射波长(Em)406 nm; 进样量 20 μL 。

2.3 实验方法

准确称取 0.3500 g 均匀的试样于 10.0 mL 的具塞玻璃比色管中; 加入 5.0 mL 的正己烷, 漩涡混合 2 min, 使油样完全溶解。分别用 3 种 BaP 专用固相萃取柱进行净化处理。

BaP 专用 SPE 小柱①(Cleanert BaP-SPE, 22 g, 60 mL)先用 30 mL 的正己烷活化清洗除去其中的干扰物, 保持湿润。将待净化的样液全部转移至 BaP 专用固相萃取柱上, 并用 2 mL 正己烷清洗比色管及塞子, 一并上样至小柱, 控制流速, 弃去以上过柱液, 用 50 mL 正己烷洗脱, 用 50 mL 的棕色容量瓶接收洗脱液并定容。将全部洗脱液转移到棕色的心型瓶, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中旋转蒸发至完全干, 后用乙腈-四氢呋喃(V:V=9:1)溶液溶解定容至 2.0 mL 的棕色容量瓶中, 用荧光液相色谱进行测定。

BaP 专用 SPE 小柱②(ProElut BaP, 22 g, 60 mL)处理方法同小柱①。

BaP 专用 SPE 小柱③(BaP-SPE Cartridge, 500 mg, 6 mL)依次用 5 mL 的二氯甲烷、5 mL 的正己烷活化小柱, 将待净化的样液全部转移至 BaP 专用固相萃取柱上, 并用 2 mL 正己烷清洗比色管及塞子, 一并上样至小柱, 控制流速, 待样液过完后, 用 10 mL 正己烷淋洗小柱, 弃去以上过柱液, 用 5 mL 二氯甲烷洗脱, 并收集洗脱液至 10 mL 的比色管中。将收集的全部洗脱液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹干, 后用 2.0 mL 乙腈溶解(先超声 1 min, 后漩涡 10 s)定容, 过 0.22 μm 的滤膜过滤, 用荧光液相色谱进行测定。

将 20 μL BaP 标准溶液和净化处理好的样品溶液先后用液相色谱仪荧光检测器(FLD)按 1.2 的色谱条件进行测定, 以保留时间定性, 以响应峰面积法定量测定。

3 结果与讨论

3.1 样品提取、净化条件选择

BaP 微溶于乙醇, 溶于苯、甲苯、二甲苯、正己烷、石油醚等有机溶剂。在有机溶液中呈蓝色荧光。苯类溶剂毒性较大, 石油醚挥发性较大, 沸点低, 考虑到有机溶剂的毒性和使用安全, 本文采用正己烷进行提取。

净化条件的选择, 填充的方式比较复杂和费时, 直接选用 BaP 专用固相萃取小柱既省时又省事, 简单快速。

3.2 色谱条件的优化

本研究优化了流动相比比例, 国家标准 GB/T 22509-2008^[19]中采用的流动相条件是乙腈+水=880+120(体积比); 但经试验, 采用乙腈+水=900+100(体积比)能够将目标峰与杂质完全分离, 且大大缩短分析时间。同时进行了荧光检测器波长条件的优化实验, 经试验激发波长(Ex)为 384 nm, 发射波长(Em)为 406 nm 为最优条件, 与国标^[19]一致。

3.3 不同 SPE 小柱的对比试验

采用 3 种不同厂家或不同型号的 BaP 专用固相萃取柱分别进行样品的净化处理。BaP 专用 SPE 小柱①和②虽然生产厂家不同, 但型号一致, 经过对比试验在食用植物油的测定过程中几乎没有差别。不同型号的 BaP 专用 SPE 小柱②和③处理过的同一食用油样品及对应的样品加标色谱图见图 1。由图 1(a)(b)可以看出: 经小柱②处理过的样品, 前期杂质的去除

效果好, 后期目标峰与杂质峰也有很好的分离, 但处理过程中试剂的用量大, 过程复杂; 经小柱③处理过的样品, 虽然前期杂质的去除效果较差, 但后期杂质的净化较好, 对目标峰没有干扰, 且处理过程中试剂的用量少, 过程简单快速。对比 2 种不同型号的 SPE 小柱, 对于目标化合物的定性定量, 2 者的差别不大, 均可以适用于食用植物油的净化处理。在食用植物油中 BaP 的日常检测中, 可根据样品的实际情况和检测的具体需求, 采用以上不同的净化处理方法。

3.4 线性范围与检出限

准确称适量 BaP 标准物质于 100 mL 的棕色容量瓶中, 用甲苯完全溶解定容, 配置浓度为 96.3 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。准确移取 1.0 mL BaP 标准储备溶液于 100 mL 的棕色容量瓶中, 用甲苯稀释定容, 配置浓度为 0.963 $\mu\text{g/mL}$ 的标准使用溶液。准确移取适量 BaP 标准使用溶液用乙腈-四氢呋喃(V:V=9:1)溶液逐级稀释配制成浓度为 0.3852、0.7704、1.5408、4.815、19.26、38.52 ng/mL BaP 标准系列溶液, 对每个浓度水平分别测定, 以响应峰面积为纵坐标, 待测物质浓度为横坐标, 绘制标准曲线。结果显示: 在 0~38.5 ng/mL 范围内, 峰面积与浓度呈现良好的线性关系, 线性方程为: $Y=150200X+1993$, 相关系数 $r=0.9998$ 。标样色谱图见图 2。

随试样同时做空白试验, 空白样平行测定 10 次, 求出空白值的标准偏差, 以 3 倍空白值的标准偏差除以方法校准曲线的斜率, 所得的值为方法的检出下限, 得出该方法的检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

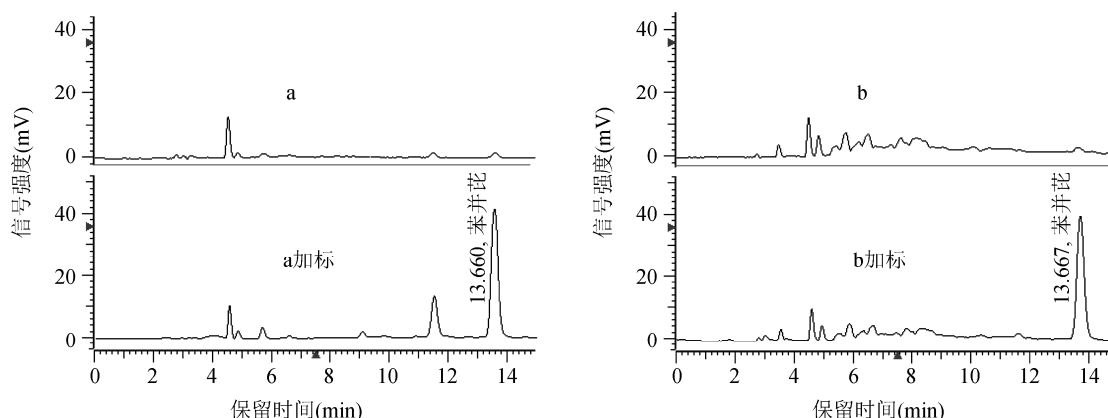


图1 经小柱②(a)和小柱③(b)处理的样品及加标样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of samples processed by SPE ② (a) and SPE ③ (b) and spiked samples

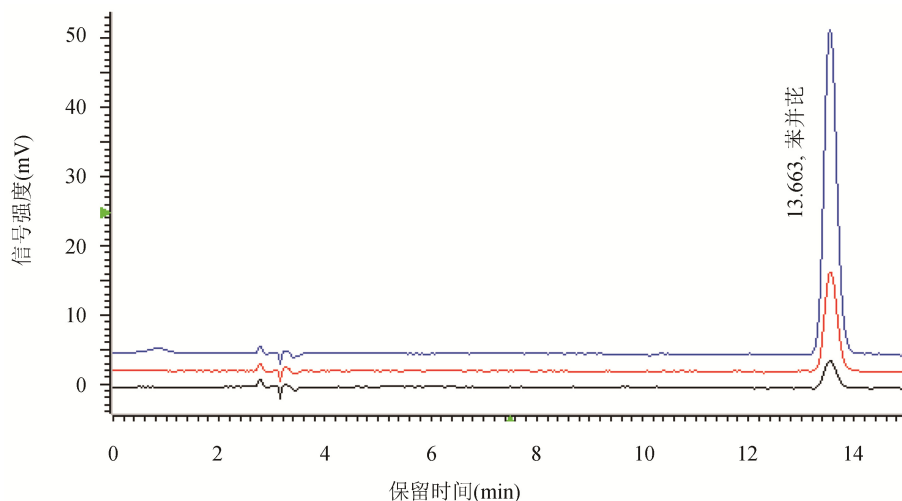


图 2 BaP 标样色谱图

Fig. 2 Chromatograms of benzo(a)pyrene standard solution

表 1 回收率试验结果

Table 1 The results of recovery test

	加标量/($\mu\text{g/kg}$)	测得量/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%
经小柱①处理	5.5	5.775	105.0
	11.0	10.142	92.2
经小柱②处理	5.5	6.006	109.2
	11.0	10.551	95.9
经小柱③处理	5.5	5.041	91.7
	11.0	11.142	101.3

3.5 回收率与精密度

采用空白样品中添加混合标准溶液的方法进行回收实验。准确称取相同的空白试样 6 份, 分别加入 38.52 ng/mL 的标液 0.05 mL 和 0.1 mL 两个不同水平的 BaP 标准溶液各三份, 分别用 BaP 专用 SPE 小柱①、②和③进行处理后测定。回收率结果见表 1。结果表明: 在添加量为 5.5~11.0.0 $\mu\text{g/kg}$ 时, 经 BaP 专用 SPE 小柱①处理的 BaP 回收率在 92.2%~105.0%之间, 经小柱②处理的 BaP 回收率在 95.9%~109.2%之间, 经小柱③处理的 BaP 回收率在 91.7%~101.3%之间, 回收率的测定结果均符合《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[20]中的要求。

方法的精密度实验以 0.3852 和 0.7704 ng/mL 浓度的标准溶液进行多次测定($n=6$), 测定值分别为: 0.3921、0.3974、0.3747、0.3846、0.4044、0.3805 ng/mL 和 0.8376、0.8253、0.7770、0.8078、0.8093、0.7710 ng/mL, 得出相对标准偏差 RSD 为 2.84 %和 3.26%,

结果表明精密度良好。

4 结 论

建立了荧光液相色谱法测定食用植物油中污染物 BaP 含量的方法。分别试验了 3 种不同苯并(a)芘专用固相萃取小柱对样品的净化效果, 不同生产厂家的同一型号的 SPE 小柱①和②使用过程及对样品的净化效果没有明显差别。同一生产厂家不同型号的 SPE 小柱②和③进行对比试验, 小柱②净化效果较好, 但试剂的使用量大, 操作步骤繁琐复杂; 小柱③净化效果较差, 但试剂的使用量小, 操作简单快速。虽然 3 种不同小柱各有各的优点和缺点, 但在样品的测定中, BaP 的峰型均较好、分离度好, 均能对 BaP 进行较好的定性和定量, 线性范围广、灵敏度高, 并且具有很好的重现性和精密度, 均适合食用植物油中 BaP 的分析检测, 且比国标^[19]中填充柱的方法方便、快速很多, 便于在检测领域推广应用。在食用植物油中 BaP 的日常检测中, 可根据样品的实际需求采用以上不同的处理方法。

参考文献

[1] 王家锦, 穆莹, 宋桂宁, 等. 苯并芘致癌致畸作用的观察与研究[J]. 中国生育健康杂志, 1997, (4): 159-161.
Wang JJ, Mu Y, Song GN, et al. Observation and research on the effects of carcinogenic and teratogenic by benzo(a)pyrene [J]. Chin J Reprod Health, 1997, (4): 159-161.

[2] 叶萌, 刘秉慈, 杜宏举. 苯并芘诱导人胚肺成纤维细胞 eyelinD1、CDK4 和 E2F-1/4 的表达改变[J]. 卫生研究, 2006,

- (2): 135–138.
- Ye M, Liu BC, Du HJ. Benzo(a)pyrene induced changes of cyclin D1, CDK4 and E2F-1/4 expression in human embryo lung fibroblasts[J]. J Hyg Res, 2006, (2): 135–138.
- [3] 吴丹. 食品中苯并芘污染的危害性及其预防措施[J]. 食品工业科技. 2008, 29(5): 309–311.
- Wu D. The harm and prevention measures of benzopyrene pollution in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, 29(5): 309–311.
- [4] Stephen A, Lesko. Chemical carcinogenesis: benzopyrene system [J]. Methods Enzymol, 1984, 105: 539–550.
- [5] Bekim S, David I, Rodenhiser. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 216(3): 458–468.
- [6] 刘治娟, 姬艳丽, 吴源, 等. 苯并芘引起鼠胸腺细胞 DNA 损伤及其机制 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19(4): 284–286.
- Liu ZJ, Ji YL, Wu Y, *et al.* Effect and mechanism of benzo(a)pyrene on DNA damage of thymocytes in mice [J]. J Health Toxicol, 2005, 19(4): 284–286.
- [7] 李永和. 3-4 苯并芘(BaP)对粮食及食品的污染 [J]. 粮食科技与经济, 1997, (4): 37–38.
- Li YH. Contamination of grain and food by 3-4 benzopyrene (BaP) [J]. Grain Technol Econ, 1997, (4): 37–38.
- [8] 王广会, 许喜林, 郭海英. 高效液相色谱法测定芝麻油中的苯并(a)芘含量[J]. 现代食品科技, 2011, 27(12): 1545–1547.
- Wang GH, Xu XL, Guo HY. Determination of benzo(a)pyrene residue in sesame oil by HPLC [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(12): 1545–1547.
- [9] Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006. Setting maximum levels for certain contaminants in Foodstuff.
- [10] GB 2716-2005 食用植物油卫生标准[S].
- GB 2716-2005 Hygienic standard for edible vegetable oil [S]
- [11] 张旦民. 荧光分析法测定食品中的 3,4-苯并芘[J]. 食品科学. 1981, (10): 52–54.
- Zhang DM. Determination of 3, 4-benzopyrene by fluorescence analysis [J]. Food Sci, 1981, (10): 52–54.
- [12] 徐杰, 吴岳英, 丁伟中. 气相色谱法测定多环芳烃时氢火焰离子化检测器响应的探讨[J]. 理化检验: 化学分册, 2010, 46(12): 1450–1452.
- Xu J, Wu YY, Ding WZ. On the responses of FID to GC determination of polycyclic hydrocarbons [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2010, 46(12): 1450–1452.
- [13] 王桂苓, 薛艳, 张伟伟, 等. GC-MS 法快速测定食品接触材料油墨中 16 中多环芳烃[J]. 化学分析计量, 2013, 22(1): 37–40.
- Wang GL, Xue Y, Zhang WW, *et al.* Determination of PAHs in ink of food contact materials by GC-MS [J]. Chem Anal Met, 2013, 22(1): 37–40.
- [14] 张永涛, 张莉, 李桂香, 等. 固相萃取-气相色谱-质谱法测定地下水中多环芳烃[J]. 理化检验: 化学分册, 2010, 46(8): 901–902.
- Zhang YT, Zhang L, Li GX, *et al.* GC-MS determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in groundwater with solid phase extraction [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2010, 46(8): 901–902.
- [15] 王焕锁, 王红勇. 双波长薄层扫描法测定油脂中苯并(a)芘[J]. 解放军预防医学杂志, 1993, 11(6): 432–434.
- Wang HS, Wang HY. Determination of benzo (a) pyrene in oils and fats by dual wavelength TLC-scanning [J]. J Prev Med Chin People's Liber Army, 1993, 11(6): 432–434.
- [16] 胡奇杰, 沈黎炜, 戚民, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中的苯并芘[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 146–148.
- Hu QJ, Shen LW, Qi M, *et al.* Determination of 3,4-benzopyrene in meat products by high performance liquid chromatography [J]. Food Res Dev, 2010, 31(6): 146–148.
- [17] 黄鸾玉, 黎小正, 秦振发. 固相萃取/高效液相色谱荧光法测定水产品中苯并芘[J]. 分析试验室, 2009, 28(12): 63–66.
- Huang LY, Li XZ, Qin ZF. The study on determination of benzopyrene in aquatic products by SPE/high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Chin J Anal Labor, 2009, 28(12): 63–66.
- [18] 苏旭, 王英杰, 张玉贞, 等. 空气中 3,4-苯并芘的微波萃取-高效液相色谱测定法[J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22(1): 64–65.
- Su X, Wang YJ, Zhang YZ, *et al.* Determination of 3,4-benzopyrene in the air by microwave extraction-high efficiency liquid chromatography [J]. Chin J Ind Med, 2009, 22(1): 64–65.
- [19] GB/T 22590-2008 动植物油脂 苯并芘的测定 反向高效液相色谱法[S].
- GB/T 22590-2008 Animal and vegetable fats and oils—determination of benzo (a) pyrene—reverse-phase high performance liquid chromatography method [S].
- [20] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories—chemical testing of food [S].

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



王桂苓, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: wangguiling0536@126.com