

金属有机骨架基质固相分散高效液相色谱法 检测食用油中苯并[a]芘

吕志杨, 杨成*

(江南大学食品学院, 无锡 214122)

摘要: **目的** 建立基于金属有机骨架材料(metal-organic frameworks, MOFs) MIL-101(Cr)的基质固相分散进行食用油样品前处理, 并以高效液相色谱串联荧光检测器(high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD)对苯并[a]芘进行定量检测。**方法** 吸附后将体系装填于6 mL固相萃取空柱, 以丙酮洗脱, 氮气吹干定容。色谱流动相为乙腈-水(80:20, *V:V*), 流速0.3 mL/min, 激发波长369 nm, 发射波长404 nm, 外标法定量。**结果** 苯并[a]芘在1~50 ng/g范围内呈良好线性, 相关系数 r^2 为0.9997, 加标回收率为96.0%~99.9%。方法检测限及定量限分别为0.33 ng/g和1.09 ng/g, 实际样品检测的相对标准偏差为2.8%~8.9%。**结论** 该方法操作简单, 测定结果准确, 同时克服了常规固相萃取法易堵塞、渗漏、过载及负压过高等问题, 可用于食用油中苯并[a]芘的检测。

关键词: 金属有机骨架材料; 基质固相分散; 高效液相色谱法; 苯并[a]芘; 食用油

Determination of benzo(a)pyrene in edible oil by matrix solid-phase dispersion based on metal-organic frameworks combined with high performance liquid chromatography

LV Zhi-Yang, YANG Cheng*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT: Objective To establish the matrix solid-phase dispersion method based on metal organic frameworks (MOFs) MIL-101 (Cr) for the pre-treatment of edible oil and determinate the benzo(a)pyrene by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detector (HPLC-FLD). **Methods** After adsorption, the system was filled in a 6 mL empty SPE column, eluted with acetone and dried with nitrogen at a constant volume. The chromatographic mobile phase was acetonitrile-water (80:20, *V:V*), the flow rate was 0.3 mL/min, the excitation wavelength was 369 nm, the emission wavelength was 404 nm and external standard method was used to quantitative determination. **Results** In the range of 1-50 ng/g, the coefficient of determination (r^2) was 0.9997, and the recoveries were 96.0%-99.9%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 0.33 ng/g and 1.09 ng/g, respectively. The relative standard deviations (RSDs) of the actual samples were 2.8%-8.9%. **Conclusions** This method is simple in operation and accurate in determination, it overcomes the problems of easy clogging, leakage, overload and high negative pressure

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602300)

Foud: Supported by National Key Research and Development Program (2018YFC1602300)

*通讯作者: 杨成, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测与分析。E-mail: yangcheng1861@jiangnan.edu.cn

*Corresponding author: YANG Cheng, Assistant Engineer, School of Food Science and technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China. E-mail: yangcheng1861@jiangnan.edu.cn

of the solid phase extraction, which is accurate and stable for application to various edible oil samples.

KEY WORDS: metal-organic frameworks; matrix solid-phase dispersion; high performance liquid chromatography; benzo(a)pyrene; edible oil

1 引言

苯并[a]芘(benzo(a)pyrene, BaP)是一种高活性间接致癌物,由于其强致癌、致突变、致畸性,是食用油质量控制标准中的重要检测目标,常因不恰当的焙炒、高温压榨等工序,使得油脂受热分解,环化聚合生成^[1,2]。国标 GB 5009.27-2016 中 BaP 最大残留量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 使用中性氧化铝柱或固相萃取小柱对食品样品进行净化,使用高效液相色谱串联荧光检测器进行定量分析^[3,4]。然而,传统柱层析法及固相萃取法净化常因油脂大分子粘稠,油脂粘附在柱中,造成堵塞、过载,填料渗漏,柱压过高,进而导致回收率不稳定等问题^[5]。另外,固相萃取柱成本较高,且通常不能再生重复利用。

近年来,国内外均致力于净化提取方法的改进,其中包括液液萃取法^[6,7]、凝胶渗透色谱法^[8]、硅胶层析法^[9]等。然而,此类方法在实际应用中操作复杂,需要特殊的仪器装置,且通量较小,耗时长,不适用于大批量样品的前处理及检测。

基质固相分散(matrix solid phase dispersion, MSPD)^[10]是一种特殊的分散式固相萃取^[11],通过研磨、搅拌使吸附剂与样品充分接触,再将体系装入固相萃取空柱,通过洗脱层析获得净化后的分析目标,是一种方便易行、重现性良好的前处理方案。

BaP 具有很强的亲脂性,分离具有一定难度,因而吸附材料的选择是方法建立和改进的重中之重。金属有机骨架(metal-organic frameworks, MOFs)是一种性能优越的多孔配位聚合物,已应用于分析化学的诸多领域^[12-14]。根据 BaP 分子直径 11.5 \AA , 本文选用了窗口孔径为 12 \AA 的 MOFs 材料 MIL-101(Cr) ^[15,16]作为吸附剂,同时利用其与 BaP 分子间较强的 π - π 相互作用^[17],设计了一种基质固相分散法,并用于食用油样品的前处理。

本研究旨在建立快捷高效、成本低廉、稳定准确的 MSPD 法,以替代传统柱层析法,解决传统固相萃取的上述问题,配合高效液相色谱-荧光检测器(high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD)对食用油中 BaP 进行定量分析。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

e2695 高效液相色谱仪、2475 荧光检测器(美国 Waters

公司); D2 PHASER X 射线衍射仪(德国布鲁克 AXS 有限公司); JEM-2100 透射式电子显微镜(日本电子株式会社); IKA VORTEX 2 旋涡振荡器(德国 IKA 公司); N-EVAPTM111 型氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司)。

苯并[a]芘标准物(96%)、 $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 、对苯二甲酸(分析纯,阿拉丁试剂(上海)有限公司); 氢氟酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)用于合成 MIL-101(Cr), 合成方法参照 Lebedev 等^[15]的文献报道; 1、3、6 mL 固相萃取空柱(生工生物工程(上海)股份有限公司); 0.22 μm 尼龙 66 滤膜(津腾实验设备有限公司); 无水乙醇、甲苯、正己烷、丙酮、乙酸乙酯(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯,美国 Fisher Chemical 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准样品的制备

苯并[a]芘储备液: 准确称量 0.05 g 苯并[a]芘粉末定容于 50 mL 甲苯中, 配制浓度为 1 mg/mL 苯并[a]芘储备液。苯并[a]芘中间液: 移取 100 μL 苯并[a]芘储备液稀释并定容于 100 mL 正己烷中, 配制为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 苯并[a]芘中间液。准确称取 0.5 g 空白食用油样品(以玉米油为例), 加标 1、5、10、20、50 ng/g 作为标准样品, 经吸附后装填固相萃取小柱处理及色谱分析后, 以峰面积-浓度制成标准曲线图。

2.2.2 固相萃取小柱的装填及样品处理

称取 0.5 g 食用油稀释于 5 mL 正己烷中, 充分分散后转移至具有单片疏水筛板的固相萃取空柱中, 置于固相萃取仪, 缓慢自然沉降或以 0.1 kg/cm^2 负压抽取液体至近干, 置入第二片疏水筛板, 压实。用 6 mL 丙酮作为洗脱溶剂, 在小于 0.1 kg/cm^2 负压下对装填后的固相萃取小柱进行洗脱。收集洗脱液, 氮气吹干浓缩后用乙腈复溶, 过 0.22 μm 有机滤膜, 待高效液相色谱分析检测。

2.2.3 高效液相色谱-荧光检测器条件

实验选用色谱柱 XSelected® HSS C₁₈ (150 mm \times 2.1 mm, 3.5 μm) 进行分离, 以乙腈-水作为流动相, 优化流动相比例, 流速为 0.3 mL/min, 流动相比例为乙腈-水(80:20, V:V)。荧光检测器的激发波长为 369 nm, 发射波长为 404 nm。苯并[a]芘在 9.4 min 左右处出峰, 峰形最佳。

3 结果与分析

3.1 MIL-101(Cr)的合成与表征

MIL-101(Cr)反应合成结束后, 其体系呈绿色, 结晶

漂浮于液面;经离心分离,上层清液为透明深绿色;干燥后的 MIL-101(Cr)为淡绿色粉末。利用粉末 X 射线衍射仪对干燥 MIL-101(Cr)进行表征,如图 1A 所示,所得图谱与晶体模拟所得图谱基本一致,在 2θ 约为 3° , 5° 及 9° 处有明显一致的特征衍射峰,证明材料的晶形良好。透射电镜图(图 1B, C)为单分散的 MIL-101(Cr)晶体的形貌,其直径约为 200~400 nm 的菱形多面体,具有良好的晶形;与文献报道^[15]的晶形结构一致,可作为固相萃取填料。

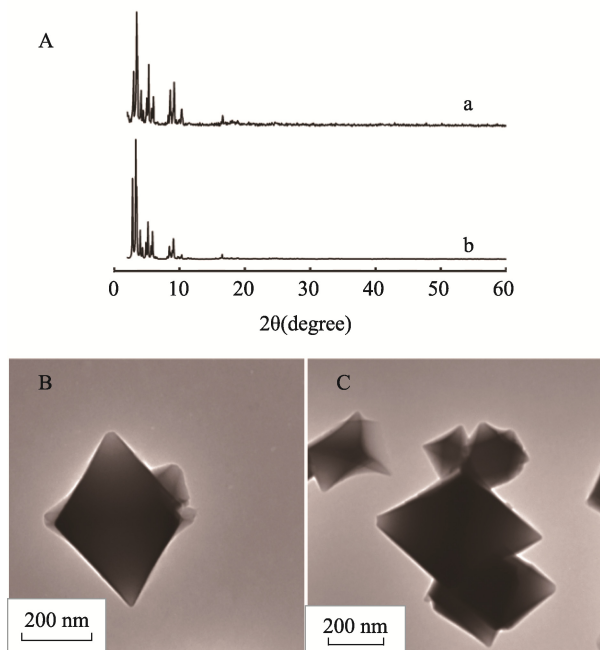


图 1 A: MIL-101(Cr)粉末 X 射线衍射图谱 a 与 CCDC 剑桥晶体数据库 X 射线衍射模拟图谱对比图 b; B, C: 单分散的 MIL-101(Cr)晶体透射电镜图

Fig. 1 A: XRD pattern of the as-synthesized MIL-101(Cr) compared with CCDC simulated pattern; B, C: TEM images of single dispersed MIL-101(Cr) crystals

3.2 前处理条件优化

3.2.1 固相萃取空柱的选择

实验选择了常见的 3 种不同体积的固相萃取空柱进行装填。如图 2 所示,装填 100 mg MIL-101(Cr)固体粉末后,填料高度具有显著差异。填料高度会直接影响样品及稀释液、洗脱液在柱内的压力。

综合评价 3 种不同容量的固相萃取柱,1 mL 及 3 mL 固相萃取容量小,压力高,容易造成装填不均匀及孔道效应,导致吸附不充分,且操作时需要固相萃取仪提供较大的负压,易造成填料的渗漏和溶剂挥发。6 mL 固相萃取柱容量合适,填料高度适中,不会造成溶剂过载,方便操作。MSPD 能够实现装柱上样一步完成,简化实验步骤,同时

仅需以足量洗脱剂充分洗脱即可,对柱效要求不高。因而,实验最终选择 6 mL 固相萃取空柱进行装填。

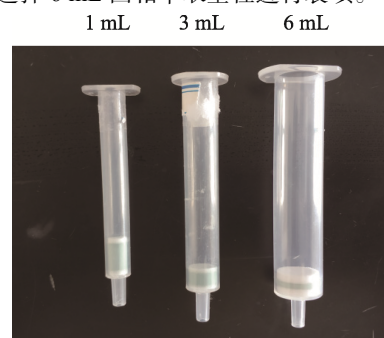


图 2 1、3、6 mL 固相萃取空柱装填 100 mg MIL-101(Cr)
Fig.2 1, 3, 6 mL solid phase extraction cartridges packed with 100 mg MIL-101(Cr)

3.2.2 溶剂的选择

实验选取正己烷、乙酸乙酯作为稀释液,选取二氯甲烷、丙酮作为洗脱液进行实验。如图 3 所示, MIL-101(Cr)在乙酸乙酯中呈团块状,在二氯甲烷中呈絮状沉淀,影响了 MIL-101(Cr)的稳定性,沉淀现象可导致柱内发生孔道效应,不利于充分的均匀沉降和层析。因而实验稀释液及洗脱液分别选取正己烷、丙酮。

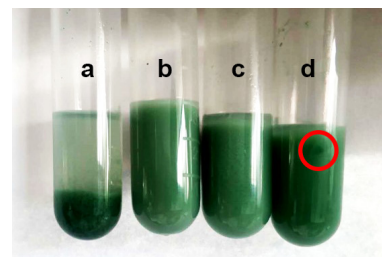


图 3 MIL-101(Cr)在(a)二氯甲烷;(b)丙酮;(c)正己烷;(d)乙酸乙酯中的分散程度及稳定性

Fig.3 The dispersion and stability of MIL-101(Cr) in (a) CH_2Cl_2 ; (b) acetone; (c) n-hexane; and (d) ethyl acetate

3.2.3 吸附容量及溶剂用量

实验对 100 mg 萃取剂 MIL-101(Cr)的吸附容量进行考察,发现随标准物质量的增加,100 mg MIL-101(Cr)可萃取约 500 ng 苯并[a]芘,随后达到饱和,峰面积不再线性增大(图 4)。实验再次确定了洗脱剂用量,发现当洗脱剂用量为 4~6 mL 时,峰面积最高,且基本保持不变,为最大程度的洗脱并尽可能对材料进行解吸附,实验选用 6 mL 丙酮进行洗脱(图 5)。

3.3 线性关系与检出限

标准样品处理后,经系统自带的积峰软件处理,以峰面积对浓度作图制成标准曲线。由图 6 可知,在 1~50 ng/g

范围内, 苯并[a]芘的线性回归方程为 $Y=2.10 \times 10^5 X + 2.44 \times 10^5$, 线性相关系数 $r^2=0.9997$ 。检出限(limit of detection, LOD, $S/N \geq 3$)为 0.33 ng/g, 定量限(limit of quantitation, LOQ, $S/N \geq 10$)为 1.09 ng/g。标准样品色谱图如图 7, 该方法满足 GB 5009.27-2016 限量的检测要求。

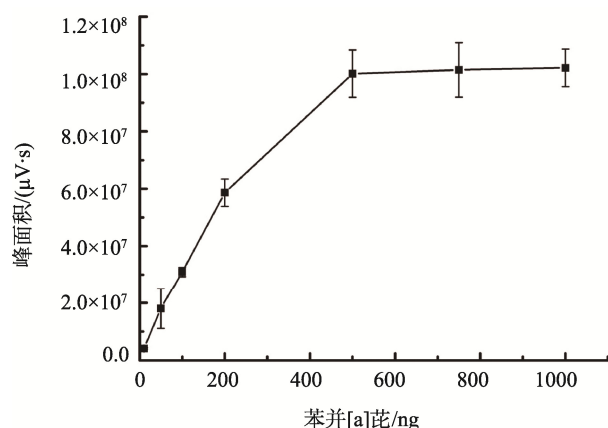


图 4 100 mg MIL-101(Cr)吸附容量 ($n=3$)
Fig. 4 The adsorption capacity of 100 mg MIL-101(Cr) ($n=3$)

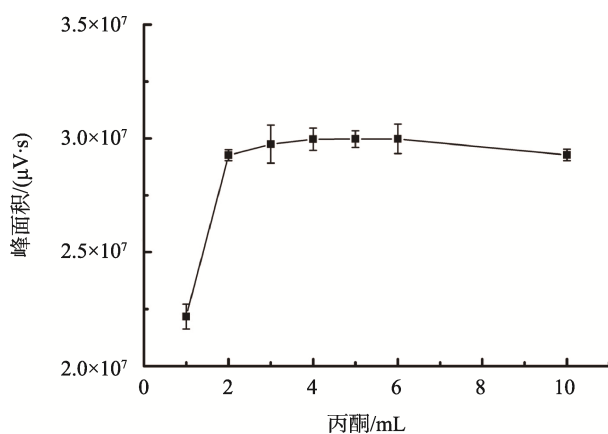


图 5 丙酮用量优化图 ($n=3$)
Fig. 5 The volume optimization of acetone ($n=3$)

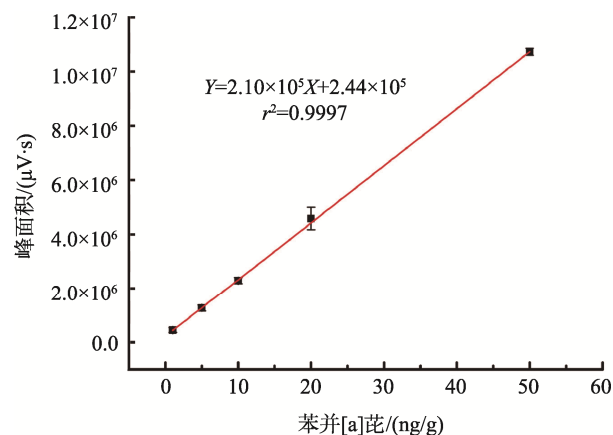


图 6 MSPD-HPLC-FLD 法标准曲线
Fig. 6 Calibration curve of the MSPD-HPLC-FLD method

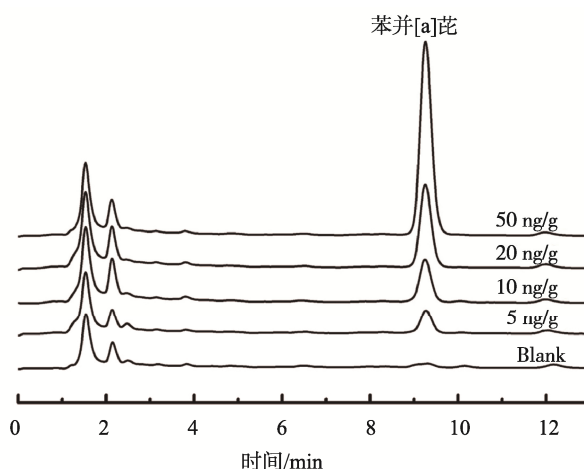


图 7 标准样品色谱图
Fig.7 Chromatograms of standard samples

3.4 加标回收实验

称取 0.5 g 食用油样品, 加入 5、10、50 ng/g 不同浓度的苯并[a]芘标准物质, 且每个浓度制备 5 个平行样品, 经本实验方法处理后进行检测, 得加标回收率结果见表 1。数据表明, 利用本实验方法得到的回收率在 96.0%~99.9% 之间, 相对标准偏差在 1.2%~9.2% 之间, 表明该法具有较高的准确度和可靠性, 符合食用油中检测苯并[a]芘的检测要求。

表 1 回收率实验测定结果 ($n=5$)
Table 1 Results of recoveries of spiked samples ($n=5$)

项目	加入标准物质浓度/(ng/g)		
	5	10	50
测定值/(ng/g)	5.10	10.40	49.10
	5.13	9.27	49.13
	4.19	9.28	49.77
平均值/(ng/g)	5.28	9.52	49.87
	5.28	9.51	50.49
	4.99	9.60	49.67
计算回收率/%	99.9	96.0	99.3
相对标准偏差/%	9.2	4.8	1.2

3.5 实际样品测定

实验选取 6 种网购食用油样品进行检测, 其中大豆油、菜籽油 1、芝麻油、花生油样品为“农家自榨食用油”。精确称取 0.5 g 样品, 每个样品进行 5 次平行实验, 经方法处理后, 使用优化后的 HPLC-FLD 条件进行检测, 其平均峰面积、相对标准偏差及浓度如表 2 所示。测定的相对标准偏差均在 2.8%~8.9% 范围内, 证明检测结果相对准确有效。其中 3 种食用油的计算值低于定量限, 大豆油、芝麻

油、花生油有检出,其中农家自榨芝麻油苯并[a]芘含量最高,但样品检出值均低于最大限量标准 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 2 实际样品测定值与结果 ($n=5$)

Table 2 The results of determination of practical samples ($n=5$)

样品	平均峰面积 ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	相对标准偏差 /%	浓度/(ng/g)
大豆油	864251.0	6.3	2.90 \pm 0.26
菜籽油 1	346964.6	2.8	ND
菜籽油 2	397343.6	8.9	ND
芝麻油	1610623.0	5.4	6.49 \pm 0.41
花生油	502415.6	4.5	1.23 \pm 0.11
花椒油	312343.6	2.8	ND

注: ND 表示未检出。

3.6 固相萃取柱的再生和再利用

装填并使用后的固相萃取柱可通过使用 6 mL 丙酮进

行洗脱及解吸附,真空环境下常温干燥,即完成固相萃取柱的再生,再生固相萃取柱可用于简单基质的萃取及除杂。实验连续 3 次使用同一批再生小柱吸附 5 mL 正己烷中 20 ng 苯并[a]芘标准物质,每批样品进行 5 次平行实验,并使用高效液相色谱法定量检测回收的苯并[a]芘含量,发现 3 次回收率均在 92.8%~105.7%之间,证明材料具有可再生能力,且其吸附性质基本保持稳定。

3.7 方法评价

实验建立的 MSPD 法与现行标准方法比较^[9],显著减少了有机溶剂用量,约为传统柱层析法的 10%(表 3)。该法可在 10 min 内完成装填上样,洗脱时间不超过 5 min,可使用固相萃取仪同时进行多样品批量处理,便捷高效;而柱层析法需提前一天控制氧化铝活度,人工装填层析柱,层析时常超过 30 min,需旋蒸并氮吹浓缩约 80 mL 有机溶剂,难以批量进行。MSPD 减少了处理后样品浑浊,可见色谱图基线平坦,杂质干扰少,是一种快捷有效,环境友好的前处理方法。

表 3 本方法与现行方法比较

Table 3 Comparison among the proposed method with current methods

方法	有机溶剂及用量	加标回收率/%
硅胶柱层析法	正己烷 30 mL, 正己烷-乙醚混合液(98:2, V:V) 80 mL	100.0~100.3
氧化铝柱层析法(石油醚洗脱)	石油醚 110 mL	54.9~66.4
氧化铝柱层析法(正己烷-乙醚洗脱)	石油醚 30 mL, 正己烷-乙醚混合液(99:1, V:V) 80 mL	90.8~100.3
溶剂萃取法	正己烷 35 mL	37.3~44.7
MIL-101(Cr) 基质固相分散	正己烷 5 mL, 丙酮 6 mL	96.0~99.9

4 结 论

本文建立了基于 MIL-101(Cr)为吸附剂基质分散固相萃取-高效液相色谱法用于检测食用油中的苯并[a]芘,同时,利用此方法检测了多种食用油样品。吸附后装填固相萃取法有效的解决了固相萃取小柱堵塞、渗漏、过载、压力过大等问题,并实现了材料及固相萃取小柱的再生和再利用,为食用油中苯并[a]芘的检测提供了高通量、低成本、操作简便的解决方案。

参考文献

- [1] 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, (5): 309-311.
Wu D. The harm and prevention measures of benzopyrene pollution in food [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, (5): 309-311.
- [2] 宋怡城. 植物油中苯并芘检测及产生机理研究[J]. 农产品加工, 2015, (10): 11-13.
Song YC. Detection and regulation of benzo(a)pyrene in oil [J]. Farm Prod Process, 2015, (10): 11-13.
- [3] GB 5009.27-2016 食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定[S].
GB 5009.27-2016 National food safety standard, Determination of benzo(a)pyrene in food [S].
- [4] Zachara A, Gakowska D, Juszczak L. Method validation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by HPLC-FLD [J]. Food Anal Methods, 2017, 10(4): 1078-1086.
- [5] 史巧巧, 席俊, 陆启玉. 食品中苯并芘的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 379-381, 386.
Shi QQ, Xi J, Lu QY. Research progress in benzopyrene in foods [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(5): 379-381, 386.
- [6] Troche SV, Falcon MSG, Amigo SG, et al. Enrichment of benzo a pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FL [J]. Talanta, 2000, 51(6): 1069-1076.
- [7] Dost K, Ideli C. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection [J]. Food Chem, 2012, 133(1): 193-199.
- [8] Wang H, Zhao L, Yang HM, et al. Determination of benzo(a)pyrene and aflatoxins (B1, B2, G1, G2) in vegetable oil by GPC-HPLC-FLD [J]. Anal Methods, 2014, 6(5): 1545-1549.
- [9] 邹燕妮, 熊巍林, 金璐, 等. 不同前处理方法对植物油中苯并(a)芘含量测定的影响[J]. 中国油脂, 2016, 41(9): 87-90.

- Zou YD, Xiong WL, Jin H, *et al.* Effect of different pretreatment methods on determination of benzo(a)pyrene content in vegetable oil [J]. *China Oils Fats*, 2016, 41(9): 87–90.
- [10] 乌日娜, 李建科. 基质固相分散在食品安全分析中的应用[J]. *食品科学*, 2005, 26(6): 266–268.
- Wu RN, Li JK. Review on applications of matrix solid-phase dispersion in food safety analysis [J]. *Food Sci*, 2005, 26(6): 266–268.
- [11] Islas G, Ibarra IS, Hernandez P, *et al.* Dispersive solid phase extraction for the analysis of veterinary drugs applied to food samples: A Review [J]. *Int J Anal Chem*, 2017, 2017: 1–16.
- [12] 杨成雄, 严秀平. 金属-有机骨架材料在样品预处理中的应用[J]. *分析化学*, 2013, 41(9): 1297–1301.
- Yang CX, Yan XP. Application of metal-organic frameworks in sample pretreatment [J]. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41(9): 1297–1301.
- [13] 孟志超, 张璐, 黄艳凤. 金属有机骨架复合材料在样品预处理中的研究进展[J]. *色谱*, 2018, 36(3): 216–221.
- Meng ZC, Zhang L, Huang YF. Development of metal-organic framework composites in sample pretreatment [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(3): 216–221.
- [14] Wang Y, Rui M, Lu G. Recent applications of metal-organic frameworks in sample pretreatment [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(1): 180–194.
- [15] Lebedev OI, Millange F, Serre C, *et al.* First direct imaging of giant pores of the metal-organic framework MIL-101 [J]. *Chem Mater*, 2005, 17(26): 6525–6527.
- [16] Dai X, Jia X, Zhao P, *et al.* A combined experimental/computational study on metal-organic framework MIL-101(Cr) as a SPE sorbent for the determination of sulphonamides in environmental water samples coupling with UPLC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2016, 154: 581–588.
- [17] Huo SH, Yan XP. Facile magnetization of metal-organic framework MIL-101 for magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples [J]. *Analyst*, 2012, 137(15): 3445–3451.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



吕志杨, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测与分析。

E-mail: 625116393@qq.com



杨成, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测与分析。

E-mail: yangcheng1861@jiangnan.edu.cn