

串联分子印迹固相萃取-高效液相色谱法 测定食用油中苯并(a)芘

金雪锋¹, 薛昆鹏^{1,2*}, 任兴发², 屠炳芳²

(1. 嘉兴市第一医院湘家荡分院, 嘉兴 314002; 2. 浙江月旭材料科技有限公司, 金华 321016)

摘要: **目的** 建立一种分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定食用油中苯并(a)芘的含量的分析方法。**方法** 在 GB 5009.27-2016《食品中苯并(a)芘的测定》试样处理方法基础上, 进一步使用 Welchrom[®] Silica 硅胶固相萃取小柱串联 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱对多种食用油基质进行净化。试样中目标物采用 Ultimate[®] XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱分离, 以乙腈和水(88:12, V:V)为流动相进行等度洗脱, 于激发波长 370 nm、发射波长 425 nm 处进行检测。**结果** 食用油试样经串联固相萃取小柱净化, 除杂的效果好、回收率高。线性范围为 1.0~100.0 μg/mL, 线性相关系数 *r* 在 0.9999, 回收率在 88.7%~101.3%之间, 检出限为 0.5 μg/kg。**结论** 本文建立的方法简便、灵敏度高、准确性好, 适用于食品中苯并(a)芘的定性定量分析。**关键词:** 高效液相色谱法; 苯并(a)芘; 分子印迹固相萃取; 食用油

Determination of benzo(a)pyrene in cooking oil by tandem molecularly imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography

JIN Xue-Feng¹, XUE Kun-Peng^{1,2*}, Ren Xing-Fa², TU Bing-Fang²

(1. Jiaxing First Hospital Xiangjiadang Branch, Jiaxing 314002, China; 2. Welch Materials (Zhejiang) Co., Ltd., Jinhua 321016, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of benzo(a)pyrene in edible oil by molecularly imprinted solid phase extraction-high performance liquid chromatography. **Methods** Based on the sample processing method of GB 5009.27-2016 *Determination of benzo(a)pyrene in foods*, Welchrom[®] Silica silica solid phase extraction cartridges were connected in series with Welchrom[®] BAP-2 molecularly imprinted solid phase extraction cartridges for purification several edible oil. The target in the sample was separated by a Ultimate[®] XB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column. The acetonitrile and water (88:12, V:V) was used as mobile for isocratic elution, and the sample was detected at an excitation wavelength of 370 nm and an emission wavelength of 425 nm. **Results** The results showed that cascaded SPE column provided good impurity elimination and high recovery on cooking oil sample. The calibration curves showed a good linearity with correlation at 0.9999. The linear range for the quantification of benzo(a)pyrene were 1.0-100.0 μg/mL. The recoveries of the method were 88.7%-101.3%. The limits of detection were 0.5 μg/kg. **Conclusion** This method is simple, sensitive, accurate and is suitable for the quantitative analysis of the benzo(a)pyrene in edible oil samples.

基金项目: 金华市科学技术研究计划项目(2017-1-040)

Fund: Supported by Jinhua Science and Technology Research Project (2017-1-040)

*通讯作者: 薛昆鹏, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: kunpengxue@welchmat.com

*Corresponding author: XUE Kun-Peng, Master, Welch Materials (Zhejiang) Co., Ltd., No.168, Shuanglin south, Road, Jinhua 321016, China. E-mail: kunpengxue@welchmat.com

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; benzo(a)pyrene; molecularly imprinted solid phase extracted; edible oil

1 引言

苯并(a)芘[benzo(a)pyrene]是一种多环芳烃类化合物,其化学结构式如图 1 所示,苯并(a)芘的化学性能非常稳定,是一种极其强烈的致癌性物质。食用油的生产工艺过程中由于温度控制不当会产生一定量的苯并(a)芘,并且,目前市场上越来越引发人们关注的“地沟油”问题其苯并(a)芘的重要的来源就是油反复受热过高和长时间高温受热导致的^[1]。因此,对于食用油中苯并(a)芘的检测愈发重要,对于保障大众的食品安全具有重要意义。

目前,常用于检测苯并(a)芘的方法主要有荧光分光光度法^[2]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[3-6]、高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)^[7,8]、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[9]、超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatography, UPLC)^[10]、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)^[11]和凝胶渗透色谱法(gel permeation chromatography, GPC)^[12,13]等。然而,上述这些检测方法均存在一些问题:有的前处理步骤复杂、有的仪器设备贵、有的灵敏度低、有的需要消耗大量的有机溶剂等。国家标准 GB 5009.27-2016^[14]推荐的检测方法主要是利用中性氧化铝固相萃取小柱或分子印迹固相萃取小柱对样品进行净化,然后用高效液相色谱-荧光法对苯并(a)芘进行分析检测,方法简便快速、灵敏度高。但是,中性氧化铝固相萃取小柱方法仍然存在一些问题,主要表现为中性氧化铝小柱的填料的活性不易控制、洗脱速度慢以及回收率难以得到保证等问题^[3];而单纯采用分子印迹固相萃取小柱又存在对菜籽油、大豆油等基质无法完全去除油脂杂质的干扰进而影响检测等问题^[4]。因此,本研究采用串联新型分子印迹(molecular imprinted polymers, MIP)聚合物填料小柱对食用油进行前处理净化,将去除油脂成分的硅胶小柱串联在分子印迹小柱上面,对油脂基质进行预吸附,然后再使用分子印迹小柱进一步净化,以克服国家标准 GB 5009.27-2016 方法存在的众多缺点。本文建立的苯并(a)芘检测方法具有高效、准确性好、重现性好等优点,极其适用于食用油中苯并(a)芘的准确定量,为相关检测工作提供参考。

2 材料与方 法

2.1 样品来源

主要实验材料为 6 种食用油,分别为菜籽油 1 号、菜

籽油 2 号、玉米油 1 号、玉米油 2 号、调和油 1 号和调和油 2 号,所有样品均购置于金华市区的农贸市场。

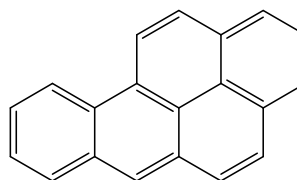


图 1 苯并(a)芘的化学结构式
Fig.1 Structure of benzo(a)pyrene

2.2 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); JP-020S 超声波清洗器(深圳市洁盟清洗设备有限公司); HSC-12B 氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司); XW-80A 涡旋混合仪振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Welchrom[®]12 位真空固相萃取装置(浙江月旭材料科技有限公司); Welchrom[®]Silica 硅胶固相萃取小柱和 Welchrom[®]BAP-2 分子印迹固相萃取小柱, (规格均为 500 mg/6 mL, 使用时将 Welchrom[®]Silica 硅胶固相萃取小柱用 SPE 转接头连接在 Welchrom[®]BAP-2 分子印迹固相萃取小柱上面串联使用)(浙江月旭材料科技有限公司)。

乙腈、正己烷和二氯甲烷(色谱纯,德国 Merck 公司); 苯并(a)芘(分析标准品,国家标准物质研究中心); 实验用水为娃哈哈超纯水(色谱级,杭州娃哈哈集团有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 实验试剂的配制

标准储备液:将 100 ng/mL 的苯并(a)芘标准溶液用乙腈:四氢呋喃(90:10, V:V)混合液逐级稀释成浓度为 0、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0 和 100.0 ng/mL 的标准系列溶液,质量浓度为 1.0~100 ng/mL。

2.3.2 样品的提取

精确称取 0.5 g 样品置于 15 mL 离心管,加入 5 mL 正己烷,涡旋混合 1 min 后,待净化。

2.3.3 样品的净化

样品的 SPE 净化分为以下 5 个步骤:①活化:向串联的固相萃取小柱中依次加入 5 mL 二氯甲烷和 5 mL 正己烷;②上样:将前述步骤中所得的待净化溶液加入活化后小柱中,控制流速为 2~3 滴/s;③淋洗:加入 5 mL 正己烷,然后将上端的硅胶小柱去掉,再加入 5 mL 正己烷淋洗下端的 BAP-2 分子印迹固相小柱;④洗脱:加入 5 mL 二氯甲烷洗脱下端的 BAP-2 小柱,收集洗脱液,并将 BAP-2 小柱抽干,合并收集的洗脱液;⑤定容:将洗脱液置于 40 °C 水浴条

件下氮吹至近干,然后用乙腈复溶并定容至 1.0 mL。过 0.22 μm PTFE 滤膜,滤液上 HPLC 仪器检测。

2.3.4 色谱条件

色谱柱:月旭 Ultimate[®] XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相:乙腈:水=88:12, V:V; 流速:1.0 mL/min; 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量:10 μL ; 荧光检测器激发波长 370 nm, 发射波长 425 nm。

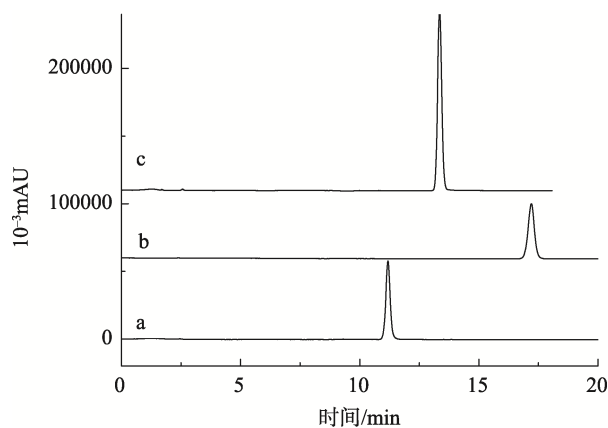
3 结果与分析

3.1 样品溶剂的选择

苯并(a)芘稳定性良好,不溶于水,溶于苯、甲苯、三氯甲烷等有机剂。正己烷为烷烃,与脂肪酸、脂肪烃和芳香烃均有良好的互溶性。实验过程中采用正己烷溶解食用油样品,并采用正己烷作为淋洗液去除油脂杂质。并且,实验过程中参考 GB 5009.27-2016 国标的方法选择二氯甲烷作为洗脱液。

3.2 色谱柱及流动相的选择

本文以简单的乙腈-水作为流动相体系,考查了 Ultimate[®] XB-C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Topsil[®] C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)、Xtimate[®] C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm)这3种色谱柱对苯并(a)芘的分离效果。结果表明,在相同条件下3种色谱柱均对苯并(a)芘均具有较好的峰型,考虑到 Ultimate[®] XB-C₁₈ 色谱柱的通用性最强,出峰时间也相对较为理想众多因素,因而本文选择 Ultimate[®] XB-C₁₈ 色谱柱进行食用油中苯并(a)芘的测定。苯并(a)芘的色谱图如图2所示。



注: a. Xtimate[®] C₁₈ 色谱柱; b. Topsil[®] C₁₈ 色谱柱; c. Ultimate[®] XB-C₁₈ 色谱柱。

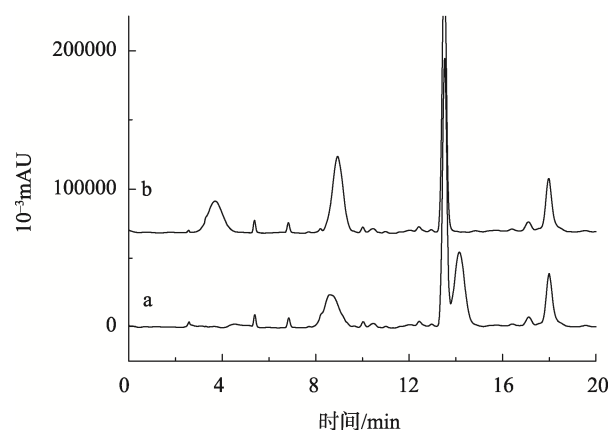
图2 苯并(a)芘标样色谱图

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

3.3 样品净化固相萃取小柱的选择

按照 GB 5009.27-2016 的要求采用商业化的 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱对食用油进行前

处理净化。实验过程中以菜籽油为检测对象,考察了单独用 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱和用 Welchrom[®] Silica 硅胶固相萃取小柱串联 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱2种前处理方式对食用油的净化效果。结果表明:仅仅采用 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱,对油脂杂质的去除效果并不完全,从而造成对目标物的检测造成一定的干扰。而采用改进的串联的固相萃取小柱则可以极大程度地去除油脂杂质的干扰,因而本文采用 Welchrom[®] Silica 硅胶固相萃取小柱串联 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱对食用油进行前处理净化。如图3所示,经过分子印迹固相萃取净化以后,基本去除了食用油中油脂等杂质成分对苯并(a)芘目标物的干扰。



注: a. Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱; 2. Welchrom[®] Silica 硅胶固相萃取小柱串联 Welchrom[®] BAP-2 分子印迹固相萃取小柱。

图3 空白样品经 SPE 小柱净化后添加苯并(a)芘液相色谱图
Fig. 3 Chromatograms of benzo(a)pyrene added to blank sample purified by SPE column

3.4 方法的线性范围、灵敏度与回收率

在“2.3”优化条件下,对苯并(a)芘标准溶液进行测定,采用峰面积定量,将逐级稀释的标准溶液分别进样 10 μL ,测定结果经线性回归,实验结果表明:苯并(a)芘含量与峰面积的线性曲线方程(Y 为峰面积, X 为进样浓度,ng/mL)为 $Y=267839.4X+7180$,相关系数为 0.9999,线性范围为 1.0~100 $\mu\text{g/mL}$,其定量限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。以基线3倍噪音($S/N=3$)考察了苯并(a)芘的检出限(limit of detection, LOD),计算得到其检出限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

以菜籽油为基质,分别加入3种不同浓度的苯并(a)芘标准溶液,样品经过提取净化后测定,计算加标回收率和精密度,结果如表1所示。实验结果表明:3种浓度加标水平下,食用油样品加标回收率在 88.7%~101.3%之间,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 1.1%~3.8%之间,均满足实验要求。

表 1 苯并(a)芘回收率测定结果(n=6)
Table 1 Recovery results of the benzo(a)pyrene (n=6)

样品名称	加标量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	RSD/%
菜籽油	5.0	4.4	89.0~91.5	3.8
	10.0	9.7	92.8~95.4	3.2
	30.0	29.1	93.9~99.7	2.3
大豆油	5.0	4.3	88.7~92.1	3.4
	10.0	9.5	92.0~95.9	2.5
	30.0	28.7	92.3~97.2	1.8
调和油	5.0	4.7	93.4~96.8	2.7
	10.0	9.7	96.1~98.6	1.2
	30.0	29.4	97.5~101.3	1.1

3.5 实际样品测定

实验中从市场上购得 6 种食用油样品,按照上述实验方法进行测定,结果表明 2 种调和油样品均未检出苯并(a)芘,而 2 种菜籽油和 2 种大豆油均能够检测出苯并(a)芘,含量分别为 1.4、1.8、1.0 和 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。国标标准 GB 2762-2017 规定,油脂及其制品中苯并(a)芘的限量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[15],因此 6 种食用油样品均未超标。鉴于抽样的产品种类较少,因而本方法在其他类型的基质中的适用性还需要进一步验证。

4 结 论

本文建立了串联分子印迹固相萃取—高效液相色谱法检测食用油中苯并(a)芘的分析方法。该方法具有简单准确、分析时间短和检测效率高等特点。同时,实验过程中改进了样品前处理净化方法,极大程度避免杂质成分对目标物的干扰,节省了大量的有机试剂,且方法回收率较高。本文建立的方法极其适用于国家标准 GB 5009.27-2016 中规定的食品中苯并(a)芘的定量分析。

参考文献

- [1] 薛昆鹏, 吴韶铭, 陈宗良, 等. 改进固相萃取-高效液相色谱法测定食用油中苯并(a)芘[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(2):140-144.
Xue KP, Wu SM, Chen ZL, *et al.* Determination of benzo (a) pyrene level in cooking oil by improved solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2015, 27(2): 140-144.
- [2] GB/T 5009.27-2003 食品中苯并(a)芘的测定[S].
GB/T 5009.27-2003 Determination of benzo(a)pyrene in foods [S].
- [3] 张海龙, 张维, 舒楠, 等. 高效液相色谱法定量分析菜籽油中的苯并芘[J]. 农产品加工, 2017, 44(9): 26-28.
Zhang HL, Zhang W, Shu N, *et al.* Quantitative determination of benzopyrene in rapeseed oil by high performance liquid chromatography [J]. Farm Prod Proce, 2017, 44(9): 26-28.
- [4] 蒋珍菊, 王雁, 杨巧. 固相萃取-高效液相法测定芝麻油中苯并(a)芘[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(17): 111-115.
Jiang ZJ, Wang Y, Yang Q. Determination of benzo(a)pyrene in sesame oil by solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. Food Res Dev, 2016, 37(17): 111-115.
- [5] 王桂苓. 高效液相色谱法测定食用植物油中苯并(a)芘的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(12): 5006-5010.
Wang GL. Determination of benzo(a)pyrene in edible vegetable oil by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(12): 5006-5010.
- [6] 吴腾, 崔向云, 扎木则仁, 等. 液相色谱法测定奶油中苯并(a)芘的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3287-3291.
Wu T, Cui XY, Zhamu ZR, *et al.* Determination of benzo(a)pyrene in cream by liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(8): 3287-3291.
- [7] 王浩, 杨红梅, 邹雷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定植物油中苯并芘与黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂[J]. 分析测试学报, 2014, 33(8): 911-916.
Wang H, Yang HM, Wu L, *et al.* Simultaneous determination of benzo(a)pyrene and aflatoxins(B₁, B₂, G₁, G₂) in vegetable oil by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(8): 911-916.
- [8] 张小涛, 侯宏卫, 陈欢, 等. 液相色谱串联质谱法测定卷烟主流烟气中的苯并[a]芘[J]. 中国烟草科学, 2016, 37(6): 77-81.
Zhang XT, Hou HW, Chen H, *et al.* Determination of benzo[a]pyrene in mainstream cigarette smoke by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin Tobacco Sci, 2016, 37(6): 77-81.
- [9] 刘玉兰, 张小涛, 赵欢欢. 液相色谱-串联质谱法检测食用油脂中苯并芘[J]. 农业机械, 2012, 10(30): 45-47.
Liu YL, Zhang XT, Zhao HH. Determination of benzo(a)pyrene in cooking oil by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Agric Mach, 2012, 10(30): 45-47.
- [10] 冯寅洁, 乔勇升, 陈伟, 等. 固相萃取-超高效液相色谱荧光法检测植物油中苯并[a]芘[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2015, 41(2): 189-194.
Feng YJ, Qiao YS, Chen W, *et al.* Determination of benzo (a) pyrene in vegetable oil by solid phase extraction-ultraperformance liquid chromatography-fluorescence detector [J]. J Zhejiang Univ (Agric Life Sci), 2015, 41(2): 189-194.
- [11] 程威威, 汪学德, 刘兵戈, 等. HPLC-FLD 和 GC-MS 测定芝麻油中苯并芘的方法比较[J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 282-287.
Chen WW, Wang XD, Liu BG, *et al.* Comparison of HPLC-FLD with GC-MS in estimation of benzo[a]pyrene in sesame oil [J]. Mod Food Sci Technol, 2015, 31(10): 282-287.
- [12] 康明芹, 曹海微, 田芳洁, 等. 凝胶色谱-超高效液相色谱测定动物油中的苯并(a)芘[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(8): 67-69.
Kang MQ, Cao HW, Tian FJ, *et al.* Determination of benzo(a)pyrene in animal oil by gel permeation chromatography-ultra performance liquid

chromatography [J]. Cere Oils, 2016, 29(8): 67–69.

- [13] 徐明雅, 潘丹杰, 金米聪. 凝胶渗透色谱法测定食用植物油中苯并(a)芘[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 240–243.

Xu MY, Pan DJ, Jin MC. Determination of benzo(a)pyrene in edible vegetable oils by gel permeation chromatography [J]. Food Sci, 2015, 36(8): 240–243.

- [14] GB 5009.27-2016 食品中苯并(a)芘的测定[S].

GB 5009.27-2016 Determination of benzo(a)pyrene in foods [S].

- [15] GB 2762-2017 食品中污染物限量[S].

GB 2762-2017 Limit of pollutants in foods [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



金雪锋, 副主任医师, 主要研究方向为非酒精性脂肪性肝炎的机制及防治。
E-mail: J170@163.com



薛昆鹏, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: kunpengxue@welchmat.com

“食源性致病微生物”专题征稿函

食源性疾病是指通过摄食而进入人体的有毒有害物质(包括生物性病原体)等致病因子所造成的疾病。近年来, 由食源性致病微生物污染食物导致中毒或死亡事件在全球频发, 食源性致病微生物引起的疾病已成为危害人类健康的头号杀手。食源性疾病的发病率居各类疾病总发病率的前列, 是当前世界上最突出的公共健康卫生问题。

鉴于此, 本刊特策划“食源性致病微生物”专题, 由上海交通大学施春雷教授担任专题主编, 主要围绕**食源性致病微生物新型快速检测技术、食源性致病微生物的分离与检测、食源性致病微生物的毒力与耐药性、食源性致病微生物风险评估、食源性致病微生物的监测与风险控制与监测分析、食源性致病微生物防控与风险评估**等展开论述和研究。本专题计划在2019年9月正刊出版。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 主编吴永宁技术总师及专题主编施春雷教授特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在2019年7月10日前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式: 注明“**食源性致病微生物**”专题

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部