

评定高效液相色谱法测定植物油中苯并芘的不确定度

黄丹丹, 段云鹏, 付滔, 蔡小钦, 黄思瑜*

(重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121)

摘要: **目的** 评定高效液相色谱法测定植物油中苯并芘含量的不确定度。**方法** 采用高效液相色谱法测定植物油中苯并芘的含量, 建立数学模型, 根据不确定度评定相关规则和标准对实验过程中的不确定度因素包括标准溶液的配制、标准曲线的拟合、回收率等进行不确定度评定。**结果** 当植物油中苯并芘含量为 1.36 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 其扩展不确定度为 0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P=95\%$, $k=2$)。**结论** 植物油中苯并芘测定的不确定度主要来源有标准溶液的配制、标准曲线拟合和重复性。

关键词: 植物油; 苯并芘; 不确定度; 高效液相色谱法

Evaluate the uncertainty of determination of benzo (a) pyrene in vegetable oil by high performance liquid chromatography

HUANG Dan-Dan, DUAN Yun-Peng, FU Tao, CAI Xiao-Qin, HUANG Si-Yu*

(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of the benzo (a) pyrene in vegetable oil by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The content of benzo (a) pyrene in vegetable oil was detected by HPLC. Based on the uncertainty evaluation and standard, a mathematical model was established, and the uncertainty resource of the experience process, including the preparation of standard curve, the fitting of standard curve and the recovery were evaluated. **Results** When the content of benzo (a) pyrene in vegetable oil was 1.36 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the expanded uncertainty was 0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P=95\%$, $k=2$). **Conclusion** The uncertainty of determination of Benzo (a) pyrene in vegetable oil mainly comes from the preparation of standard solution, standard curve fitting and repeatability.

KEY WORDS: vegetable oil; benzo (a) pyrene; uncertainty; high performance liquid chromatography

1 引言

苯并芘是多环芳烃类致癌性最强的一种有毒有害化合物, 是世界卫生组织确认的 3 大致癌物之一^[1]。苯并芘含量较高的食品有熏烤食品、油炸食品、植物油等, 主要产生原因有: 熏烤食品中的燃料不完全燃烧会使烟中含有大量苯并芘, 可附着于食品表面并逐渐迁移至内部^[2]; 食

品中的有机物在高温条件下, 脂肪、甘油三酯等裂解产生自由基, 经过热聚合形成苯并芘; 植物油的生产加工工艺不当会导致苯并芘的残留^[3]; 在加工(机械润滑油泄露、沥青路面晒粮食)、贮存、包装(包装纸上的不纯石蜡油)过程中食品也易受到苯并芘的污染^[4,5]。我国《食品安全国家标准 食品中污染物限量》^[6]明确规定了各类食品中苯并芘的限量范围, 谷物及其制品、熏烧烤肉、熏烤水产品小于

*通讯作者: 黄思瑜, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 260913681@qq.com

*Corresponding author: HUANG Si-Yu, Master, Engineer, Chongqing Institute for Food and Drug Control, No 1, Chunlan Road, Chongqing 401121, China. E-mail: 260913681@qq.com

5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 油脂及其制品小于 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

苯并芘具有较强的脂溶性, 因而油脂极易受到污染^[7], 近年我国已将植物油列入食品安全监督抽检和风险监测的重点监控食品^[8,9], 本研究采用国标方法 GB 5009.27-2016 《食品安全国家标准 食品中苯并芘的测定》^[10], 利用高效液相色谱荧光法检测植物油中苯并芘的含量^[11], 并依据 JJF 1059.1-2012 《测量不确定度评定与表示》^[12]分析实验过程各因素产生的不确定度, 确定影响检验结果不确定度的主要因素, 以期提高植物油中苯并芘检测精准度, 对检验过程的质量控制产生指导意义^[13]。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国赛默飞公司); SQP 电子天平(德国赛多利斯公司); RV10 旋蒸仪(德国艾卡公司); MD200-2 氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

食用植物油(市售), 苯并芘标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma 公司), 正己烷(色谱纯, Tedia 公司), 中性氧化铝柱(30 mL, 60 mg, Agela 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配置

吸取苯并芘标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)100 μL 定容至 100 mL 容量瓶中, 得到浓度为 100 ng/mL 的标准工作液, 再将工作液逐级稀释为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 的系列标准溶液。

2.2.2 样品制备

称取 0.4 g 左右的食用植物油, 加入 5 mL 正己烷溶解待净化, 用 30 mL 正己烷活化中性氧化铝柱, 加入待净化液, 继续用 50 mL 正己烷洗脱, 收集洗脱液, 将净化液旋蒸至约 1 mL, 转移至氮吹管, 氮吹至近干后加 1 mL 乙腈定容, 涡旋溶解后过 0.45 μm 微孔滤膜。

2.2.3 色谱条件

色谱柱: 安捷伦 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 洗脱方式: 等度洗脱; 流动相: 乙腈: 水=88:12, (V/V); 流速: 1 mL/min; 进样量: 20 μL ; 激发波长: 384 nm; 发射波长: 406 nm。

2.3 数学模型

待测样品中苯并芘含量计算公式:

$$X = \frac{C \times V}{m} \times \frac{1000}{1000}$$

X: 试样中苯并芘含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$; C: 样品浓度, ng/mL ; V: 试样最终定容体积, mL; m: 试样质量, g。

3 结果与分析

3.1 不确定度来源分析

通过分析实验流程, 苯并芘不确定度的来源主要有:

样品称量、标准溶液的配制、标准曲线的拟合、重复性(随机效应)、回收率(样品处理)等。

3.2 标准品引入的不确定度

标准品苯并芘引入的不确定度由苯并芘标准溶液的浓度、标准溶液的配制和标准曲线的拟合 3 个部分组成。

3.2.1 标准溶液浓度的不确定度

采用 B 类评定方法, 根据标准物质证书提供的信息, 苯并芘的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 不确定度为 3%, 在置信区间为 95%, 按均匀分布计算, 包含因子 $k=2$, 由苯并芘标准品引入的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(\text{std}) = \frac{u(\text{std})}{k \times C} \times 100\% = \frac{3\%}{2 \times 100} \times 100\% = 0.015\%$$

3.2.2 标准溶液配制引入的不确定度

标准溶液配制过程中使用 200 μL 的移液器吸取 100 μL 的苯并芘标准溶液, 按矩形分布考虑, $k=\sqrt{3}$, 标准不确定度为^[14]:

$$u_{(\text{移液器})} = \frac{a}{k} = \frac{200 \times 2\%}{\sqrt{3}} = 2.31 \mu\text{L}$$

$$u_{\text{rel}(\text{移液器})} = \frac{u_{(\text{移液器})}}{V} = \frac{2.31}{100} = 0.023$$

配制过程中使用的其他玻璃器具, 均按矩形分布考虑, $k=\sqrt{3}$, 相对标准不确定度如表 1 所示^[15]。

配制标准溶液引入的相对标准不确定度为 $u_{\text{rel}}(\text{std})_2 = 2.49 \times 10^{-2}$ 。

3.2.3 标准曲线拟合引入的不确定度

对 5 个不同浓度的苯并芘标准溶液进行测定, 每个标准点测量 3 次, 以苯并芘浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 通过直线拟合得到标准曲线, 见表 2 所示, $Y=129736X$, $r^2=1$ 。

对样品进行 2 次平行测定, 得到样品浓度均值为 $\bar{X} = 0.5850 \text{ ng}/\text{mL}$ 。标准溶液浓度平均值 $\bar{x} = 7.3 \text{ ng}/\text{mL}$,

标准曲线的标准偏差为 $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [Y_i - kx_i]^2}{n-2}} = 4.97 \times 10^3$, 由标准曲线引入的不确定度公式为

$$u(\text{std})_3 = \frac{s}{k} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}, \text{ 其中 } k=129736, p=2, n=15,$$

$$u(\text{std})_3 = \frac{4.97 \times 10^3}{k} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{15} + \frac{(0.5850 - 7.3)^2}{\sum_{i=1}^{15} (c_i - \bar{c})^2}} = \frac{4.97 \times 10^3}{129736}$$

$$\sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{15} + \frac{(0.5850 - 7.3)^2}{778.99}} = 0.33$$

$$\text{相对标准不确定度 } u_{\text{rel}}(\text{std})_3 = \frac{u(\text{std})_3}{x} = \frac{0.033}{0.5850} = 0.056。$$

表 1 标准溶液配制过程计量器具引起的相对标准不确定度
Table 1 The relative uncertainty of meter in preparation standard

计量器具	使用体积/mL	使用次数/次	最大允许误差/mL	包含因子	相对标准不确定度
0.5 mL 移液管	0.5	1	0.005	$\sqrt{3}$	5.77×10^{-3}
1 mL 移液管	1	2	0.008	$\sqrt{3}$	6.53×10^{-3}
2 mL 移液管	2	1	0.010	$\sqrt{3}$	2.89×10^{-3}
5 mL 移液管	5	1	0.015	$\sqrt{3}$	1.73×10^{-3}
100 mL 容量瓶	100	4	0.1	$\sqrt{3}$	1.15×10^{-3}
10 mL 容量瓶	10	2	0.02	$\sqrt{3}$	1.63×10^{-3}

表 2 系列标准溶液峰面积的测定结果
Table 2 Determination of peak area of series standard solutions

浓度 C/(ng/mL)	峰面积 Y ₁	峰面积 Y ₂	峰面积 Y ₃	平均值
0.5	69818.523	64370.992	70604.793	68264.769
1.0	128745.757	128666.778	135947.227	131119.921
5.0	647488.863	635032.293	652758.120	645093.092
10.0	1295369.022	1294693.475	1298067.733	1296043.410
20.0	2595789.634	2596981.863	2595626.433	2596132.643

3.2.4 标准溶液合成标准不确定度

$$u_{rel}(std) = \sqrt{u_{rel}(std)_1^2 + u_{rel}(std)_2^2 + u_{rel}(std)_3^2} = 0.061$$

3.3 样品制备引入的不确定度

3.3.1 电子天平的不确定度

称取植物油脂样品 0.400 g。根据天平校准证书, 允许误差为 $u=0.1$ mg, 按均匀分布计算, $k=\sqrt{3}$, 不确定度为 $u(m)_0 = \frac{u}{k} = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 5.77 \times 10^{-2}$, 称量时采用去皮清零法, 由此引入的不确定度为 $u(m) = \sqrt{2 \times u(m)_0^2} = \sqrt{2 \times 0.0577^2} = 0.082$ mg, 则相对不确定度为 $u_{rel}(m) = \frac{u(m)}{m} = 2.05 \times 10^{-4}$ 。

3.3.2 定容体积引入的不确定度

样品氮吹至近干后, 用 1 mL 移液管吸取 1 mL 乙腈定容, 其相对标准不确定度为 $u_{rel}(V) = \frac{u}{V \times k} = \frac{0.008}{1 \times \sqrt{3}} = 4.62 \times 10^{-3}$ 。

3.3.3 样品净化引入的不确定度

样品前处理需经中性氧化铝柱净化, 对结果的回收率会产生一定的影响, 引入不确定度, 本文采用加标回收的方式进行评定, 在样品中加入 25 μ L 20 ng/mL 的苯并芘标准溶液, 经检测计算回收率结果如表 3 所示:

$$\text{标准差 } s(R) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_i^n (X_i - \bar{X})^2} = 0.0028$$

$\bar{R}=88.3\%$, 不确定度 $u(R) = \frac{s(R)}{\sqrt{n}} = 0.0011$, 相对标准不确

定度 $u_{rel}(R) = \frac{u(R)}{R} = 0.0013$ 。

表 3 食用油中苯并芘加标回收结果
Table 3 Recovery of benzo (a) pyrene in vegetable oil

	1	2	3	4	5	6
本底值/ng	0.5837	0.5837	0.5837	0.5837	0.5837	0.5837
测量值/ng	1.02	1.04	1.03	1.03	0.98	1.06
加标量/ng	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
回收率/%	87.00	91.00	89.00	89.00	79.00	95.00

3.3.4 样品制备的合成标准不确定度

$$u_{rel}(C) = \sqrt{u_{rel}(m)^2 + u_{rel}(V)^2 + u_{rel}(R)^2} = 0.0048$$

3.4 测量重复性产生的不确定度

同一样品进行 6 次平行测定, 结果分别为 1.36、1.30、1.40、1.26、1.28、1.47 μ g/kg, 平均值为 $\bar{X}=1.35$ μ g/kg, 相对标准偏差为 $s(rep) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_i^n (x_i - \bar{x})^2} = 0.081$, 标准不确定度为 $u(rep) = \frac{s(rep)}{\sqrt{n}} = 0.033$, 相对不确定度为

$$u_{rel}(rep) = \frac{u(rep)}{\bar{X}} = \frac{0.033}{1.35} = 0.024$$

3.5 合成标准不确定度及扩展不确定度

3.5.1 合成标准不确定度

各相对标准不确定度分量合成:

$$u_{\text{rel}}(X) = \sqrt{u_{\text{rel}}(\text{std})^2 + u_{\text{rel}}(C)^2 + u_{\text{rel}}(\text{rep})^2}$$

3.5.2 扩展不确定度

取置信概率 $P=95\%$, $k=2$, 则扩展不确定度为:

$$u = u_{\text{rel}}(X) \times k \times \bar{X} = 0.066 \times 2 \times 1.36 = 0.18$$

3.5.3 不确定度报告

$$X = (1.36 \pm 0.18) \mu\text{g}/\text{kg} \quad (k=2, P=95\%)$$

3.5.4 不确定度各分量结果

所有相对标准不确定度的分量汇总如表 4。

表 4 各分量的相对标准不确定度
Table 4 The relative uncertainty of different components

项目	分量	相对标准不确定度/%
标准物质	std_1	0.015
标准溶液稀释	std_2	2.49
标准曲线拟合	std_3	5.6
样品称量	m/mg	0.0205
样品定容	V/mL	0.462
重复性	rep	2.4
回收率	$R/\%$	0.13

4 结论

植物油中苯并芘含量的测量不确定度来源于标准溶液稀释、标准曲线拟合和重复性测定, 标准溶液稀释引入的不确定度和选择的计量器具有一定关系; 标准曲线的拟合引入的不确定度和检测值的浓度有一定相关性。当植物油中苯并芘含量为 $1.36 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 其扩展不确定度为 $0.18 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($P=95\%$, $k=2$)。因此在实际检测工作中, 要严格把控标准溶液的配制过程, 选择精密度高的器具; 调整标准曲线的线性范围使待测点尽量在标准曲线的中间范围, 可适当增加低浓度的标准点; 增加平行样的测定, 规范操作, 提高人员技能, 减少人为误差, 以提高检测结果的准确性。

参考文献

- [1] 陈志鸿, 黄海燕, 戴娟秀. 苯并芘致癌相关的表观遗传学机制[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(6): 465-468.
Chen ZH, Huang HY, Dai JX. Epigenetic mechanism of benzopyrene carcinogenesis [J]. J Toxicol, 2016, 30(6): 465-468.
- [2] 高宁宁, 胡萍, 朱秋劲, 等. 烟熏液及其在肉制品中的应用研究进展[J]. 肉类研究, 2019, 33(1): 66-70.
Gao NN, Hu P, Zhu JQ, et al. Recent progress in liquid smoke and its application in meat products [J]. Meat Res, 2019, 33(1): 66-70.
- [3] 陈焱. 油茶籽油加工过程中苯并(a)芘形成及控制技术[J]. 食品安全导刊, 2018, (30): 183-185.
Chen G. Formation and control technology of benzo (a) pyrene in camellia seed oil processing [J]. Chin Food Saf Mag, 2018, (30): 183-185.
- [4] 张杏敏, 宋伟光, 陈运霞, 等. 棉籽及棉籽油中苯并芘的来源研究[J]. 中国油脂, 2017, 42(5): 100-102.

- Zhang XM, Song WG, Chen YX, et al. Source of benzopyrene in cottonseed and cottonseed oil [J]. Chin Oils Fats, 2017, 42(5): 100-102.
- [5] 冯亚净, 王瑞鑫, 李书国. 食品中苯并芘的来源及减控方法的研究[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(2): 72-75.
Feng YJ, Wang RX, Li SG. Review on the sources and reducing strategies of benzo (a) pyrene in foods [J]. Cereals Oil, 2017, 30(2): 72-75.
- [6] GB 2762-2017 食品安全国家标准 食品中污染物限量[S].
GB 2762-2017 National food safety standard-Limit of contaminant in food [S].
- [7] 郝蔚霞. 植物油中苯并[a]芘安全风险分析及有效防控措施的探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2558-2562.
Hao WX. Study on the security risk analysis and effective prevention and control measures of benzo [a] pyrene in vegetable oil [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(7): 2558-2562.
- [8] 魏利清, 郝全英, 俞寅. 油料中苯并(a)芘含量的测定[J]. 中国油脂, 2019, 44(4): 146-148.
Wei LQ, Hao QY, Yu Y. Determination of benzo (a) pyrene in oilseed [J]. Chin Oils Fats, 2019, 44(4): 146-148.
- [9] 叶韬, 王昆, 陈志娜, 等. 油炸调理肉串过程煎炸条件对大豆油苯并芘含量及理化指标的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(5): 49-54.
Ye T, Wang K, Chen ZN, et al. The effect of frying conditions on the B (a) P content and physico-chemical properties of soybean oil during frying frozen kebabs [J]. J Chin Cereals Oil Assoc, 2018, 33(5): 49-54.
- [10] 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-The detection of B (a) P in food [S].
- [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): 282-286, 306.
Cheng 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): 282-286, 306.
- [12] JJF 1059. 1-2012 测量不确定度评定与表示[S].
JJF 1059. 1-2012 Measurement uncertainty evaluation and representation [S].
- [13] 陈晨, 陈妍, 倪炜华, 等. 高效液相色谱法测定食品中脱氢乙酸的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, (9): 2660-2663.
Chen C, Chen Y, Ni WH, et al. Evaluation of uncertainty for the determination of dehydroacetic acid in food by high performance liquid chromatography [J]. J Food Safe Qual, 2019, (9): 2660-2663.
- [14] JJG 646-2006 移液器检定规程[S].
JJG 646-2006 Verification method of the pipette [S].
- [15] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification method of the working glass container [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

黄丹丹, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 326858063@qq.com

黄思瑜, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 260913681@qq.com