

# 液相色谱法测定油脂及其制品中苯并(a)芘含量

滕小沛, 阮丽萍, 刘华良\*

(江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

**摘要: 目的** 建立液相色谱法测定油脂及其制品中苯并(a)芘的方法。**方法** 试样经过正己烷提取, 中性氧化铝或分子印迹小柱净化, C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 荧光检测器检测。**结果** 方法的线性范围为 0.5~20 μg/L, 线性相关系数为 0.9999, 最低定量浓度(the limit of quantity, LOQ)为 0.5 μg/kg, 在 0.5、5、15 μg/kg 3 个添加水平下平均回收率为 75.5%~93.8%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 3.0%~9.6%。**结论** 该方法准确度与精密度满足 GB/T 27404 规定, 定量限满足 GB 2762 实施要求, 被用于修订 GB/T 5009.27-2003 为 GB 5009.27-2016。

**关键词:** 液相色谱法; 油脂及其制品; 苯并(a)芘

## Determination of benzo(a)pyrene in fats and oils and their products by liquid chromatography

TENG Xiao-Pei, RUAN Li-Ping, LIU Hua-Liang\*

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of benzo(a)pyrene in fats and oils and their products samples by liquid chromatography (LC). **Methods** The samples were extracted by *N*-hexane, purified by neutral alumina or molecularly imprinted column, separated by C<sub>18</sub> column and detected by fluorescence detector. **Results** The method showed a good linearity in the range of 0.5–20 μg/L with correlation coefficients of 0.9999, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.5 μg/kg. The average recoveries were 75.5%–93.8% at the spiked level of 0.5, 5, 15 μg/kg with the relative standard deviation (RSD) of 3.0%–9.6%. **Conclusion** The accuracy and precision of this method meet the requirements of GB/T 27404. The limit of quantitation meets the implementation requirements of GB 2762. This method has been used to revise GB/T 5009.27-2003 to GB 5009.27-2016.

**KEY WORDS:** liquid chromatography; fats and oils and their products; benzo(a)pyrene; fats; oils

## 1 引言

苯并(a)芘(benzo(a)pyrene), CAS 号 50-32-8, 分子式 C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>, 相对分子质量 252.32, 熔点 79 °C, 沸点 475 °C, 为无色至淡黄色晶体, 不溶于水, 微溶于乙醇、甲醇, 溶于苯、甲苯、二甲苯、氯仿、乙醚、丙酮等。其化学性质稳

定, 但在光照下易降解。苯并(a)芘是动物致癌物, 是可能的人类致癌物, 是食品加工过程形成的有害物<sup>[1]</sup>。GB 2762-2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》规定油脂及其制品中苯并(a)芘限量为 10 μg/kg<sup>[2]</sup>。欧盟法规 Regulation(EC)No 835/2011 相应的限量为 2 μg/kg<sup>[3]</sup>。

GB/T 5009.27-2003《食品中苯并(a)芘的测定》中的苯

基金项目: 国家食品安全标准制修订项目(ZHENGHE-2015-369)

Fund: Supported by National Food Safety Standards Revision Project (ZHENGHE-2015-369)

\*通讯作者: 刘华良, 副研究员, 主要研究方向为理化检验标准方法。E-mail: LHL-1@163.com

\*Corresponding author: LIU Hua-Liang, Associate Researcher, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China. E-mail: LHL-1@163.com

并(a)苊检测方法为荧光分光光度法<sup>[4]</sup>。样品经环己烷稀释、二甲基甲酰胺萃取、环己烷反萃取、手工装填氧化铝柱层析净化、乙酰化纸色谱分离、荧光斑点溶解、荧光分光光度法定量。

GB/T 22509-2008《动植物油脂苯并(a)苊的测定 反相高效液相色谱法》(等同采用了 ISO 15302:2007)中,样品经溶剂溶解,通过氧化铝柱吸附后洗脱苯并(a)苊,用反相高效液相色谱分离,荧光检测器检测,根据色谱峰的保留时间定性,外标法定量<sup>[5]</sup>。

GB/T 5009.27-2003 所采用的纸色谱荧光光度法可操作性差,GB/T 22509-2008 虽采用了先进的液相色谱法,但检测对象仅限于油脂类食品,与 GB 2762-2017 不对应。根据国家食品安全标准委员会秘书处的要求,本研究对以上 2 个标准进行整合,形成 GB 5009.27-2016《食品安全国家标准 食品中苯并(a)苊的测定》<sup>[6]</sup>。本次整合创新处有 3 条,一是样品前处理方面保留了 GB/T 22509-2008 中氧化铝柱层析法,但变手工装填为商品化柱,同时引入已经商品化的分子印迹柱作为第二种净化方法<sup>[7]</sup>。二是仪器检测方面采用了 GB/T 22509-2008 液相色谱法,但将多环芳烃分析柱改为通用型 C18 柱,以降低检测成本。三是适用范围方面在 GB/T 5009.27-2003 基础上增加了黄油等油脂制品,与 GB 2762-2017 完全对应。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料与试剂

花生油(中国鲁花公司);人造黄油(新西兰 Anchor 公司);甲苯、乙腈、正己烷与二氯甲烷(色谱纯,德国 Merck 公司);苯并(a)苊(纯度 $\geq 99.0\%$ ),苯并(a)苊分子印迹柱(500 mg, 6 mL)(中国安谱公司);中性氧化铝柱(填料粒径 75~150  $\mu\text{m}$ , 22 g, 60 mL, 中国迪马公司)。

### 2.2 仪器与设备

2695 液相色谱仪(配有荧光检测,美国 Waters 公司);1-14 离心机(转速 $\geq 4000$  r/min, 美国 Sigma 公司);固相萃取装置(中国迪马公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 标准溶液配制

苯并(a)苊标准储备液(100  $\mu\text{g/mL}$ ):准确称取苯并(a)苊 1 mg(精确到 0.01 mg)于 10 mL 容量瓶中,用甲苯溶解,定容。避光保存在 0~5  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中,保存期为 1 年以上。

苯并(a)苊标准中间液(1.0  $\mu\text{g/mL}$ ):准确吸取 0.10 mL 苯并(a)苊标准储备液(100  $\mu\text{g/mL}$ ),用乙腈定容到 10 mL。避光保存在 0~5  $^{\circ}\text{C}$  的冰箱中,保存期 1 个月。

苯并(a)苊标准工作液:准确吸取 0.2 mL 苯并(a)苊标准中间液(1.0  $\mu\text{g/mL}$ ),用乙腈定容到 10 mL。得 50 ng/mL 标液,再依次用乙腈稀释得到 0.5、1.0、5.0、10.0、

20.0 ng/mL 的校准曲线溶液,临用现配。

#### 2.3.2 样品前处理

提取:称取 0.4 g(精确到 0.001 g)花生油试样,加入 5 mL 正己烷,旋涡混合 0.5 min,待净化。对于人造黄油等含水油脂制品,加入正己烷旋涡混合后增加 4000 r/min 离心 5 min 的步骤,转移出正己烷层待净化。

净化方法 1(中性氧化铝柱):用 30 mL 正己烷活化柱子,待液面降至柱床时,关闭底部旋塞。将待净化液转移进柱子,打开旋塞,以 1 mL/min 的速度收集净化液到茄形瓶,再转入 50 mL 正己烷洗脱,继续收集净化液。将净化液在 40  $^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸至约 1 mL,转移至色谱仪进样小瓶,在 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气流下浓缩至近干。用 1 mL 正己烷清洗茄形瓶,将洗涤液再次转移至进样小瓶并浓缩至干。准确吸取 0.4 mL 乙腈到进样小瓶,涡旋复溶 0.5 min,过微孔滤膜后供液相色谱测定。

净化方法 2(分子印迹柱):依次用 5 mL 二氯甲烷及 5 mL 正己烷活化柱子。将待净化液转移进柱子,待液面降至柱床时,用 6 mL 正己烷淋洗柱子,弃去流出液。用 6 mL 二氯甲烷洗脱并收集净化液到 10 mL 试管中。将净化液在 40  $^{\circ}\text{C}$  下氮气吹干,准确吸取 0.4 mL 乙腈涡旋复溶 0.5 min,过微孔滤膜后供液相色谱测定。

#### 2.3.3 仪器条件

色谱柱: C<sub>18</sub> 柱(4.6 mm $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ;流动相: 乙腈+水=88+12;流量: 1.0 mL/min;检测波长: 激发波长 384 nm, 发射波长 406 nm;进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 方法的适用范围

GB/T 5009.27-2003 适用范围为植物油,GB/T 22509-2008 适用范围为动植物油脂,GB 2762 规定了油脂及其制品中苯并(a)苊限量为 10  $\mu\text{g/kg}$ 。根据检测方法标准是限量标准的技术支撑原则,故修订后检测方法标准适用范围为油脂及其制品。根据 GB 2760 附录 F《食品分类系统》,油脂及其制品分成不含水的油脂(如植物油、动物油脂)与水油状脂肪乳化制品(如黄油)。本次修订在原 2 个标准的适用范围基础上增加了水油状脂肪乳化制品。即若样品为人造黄油等含水油脂制品,需要加入正己烷溶剂,溶解成液态后,离心,转移出上层正己烷,其余同不含水的油脂的处理步骤。

### 3.2 样品净化方法

中性氧化铝净化方式引自 GB/T 22509-2008(采标 ISO 15302: 2007),该法是净化油脂样品的经典方法。近年来,国内市场上有商品化的中性氧化铝柱子出售,其填料的含量(22 g)等参数与 GB/T 22509-2008 一致,只是做成了商品方便实验人员直接使用。但需要注意的是,空气中水分对

氧化铝柱子的性能影响很大, 打开包装后应立即使用或密闭避光保存。本标准方法在请同行实验室验证时, 某实验室就因为氧化铝净化柱拆开包装后未及使用吸潮, 导致检测结果异常。

相比与传统的固相萃取技术, 分子印迹固相萃取 (molecularly imprinted solid phase extraction, MI-SPE) 对特定分子具有特异的选择性<sup>[8,9]</sup>, 能从复杂基质样品中选择性地分离富集目标分子, 在复杂样品前处理领域中展现出巨大的发展潜力和广阔的应用前景<sup>[10]</sup>。MI-SPE 过程与常规 SPE 过程相似, 通常先将 50~500 mg 分子印迹聚合物装填人萃取柱中备用, 然后再经预处理、加样、洗涤除杂质和洗脱 4 个步骤<sup>[11]</sup>。文献报道 MI-SPE 已经用于苹果中 2, 4-二氯苯氧乙酸<sup>[12]</sup>、粮食中乙酰甲胺磷<sup>[13]</sup>、猪肉中左氧氟沙星<sup>[14]</sup>、烤肉中多环芳烃<sup>[15]</sup>。

食品中苯并(a)芘的测定难点在样品前处理过程, 本次整合修订保留了经典的氧化铝净化技术, 首次引入了分子印迹技术, 两者都是有成熟可靠的商品化产品, 采用它们可以减少检验人员的工作量, 减少人员操作误差。分子印迹净化技术优点是净化效果良好的同时, 有机溶剂消耗量大幅度减少, 但毕竟是相对较新的产品, 由于不同品牌分子印迹柱质量存在差异, 建议对质控样品进行测试, 或做加标回收试验, 以完成试剂耗材验收步骤。

### 3.3 液相色谱参数

色谱柱: 在满足色谱分辨率与选择性的前提下, 更改多环芳香烃分析柱为 C<sub>18</sub> 柱。后者属于通用柱, 成本更低。NY/T 1666、SC/T 3041 等检测标准也是采用 C<sub>18</sub> 柱。

进样前定容体积: 原 0.1 mL 的定容体积太小, 需要使用内衬管, 检测成本增加, 且有机溶剂蒸发更会造成检测结果偏高。修订后把 0.1 mL 增大为 0.4 mL, 解决了上述问题。

进样体积: 由 10  $\mu$ L 调整为 20  $\mu$ L, 后者是 4.6 mm 内径色谱柱的通用进样体积, 本修订使仪器检测灵敏度翻倍。苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图见图 1。

### 3.4 方法的线性范围、检出限与定量限

在 0.5~20 ng/mL 之间, 其进样浓度(X)与色谱峰面积(Y)呈线性, 线性方程为  $Y=3293049X-141548$ , 相关系数  $r$  为 0.9999。

依据 GB/T 27404-2008<sup>[16]</sup>, 平行测定 20 份加标水平为 0.5  $\mu$ g/kg 的植物油样品, 求出待测物峰面积的标准偏差( $S_b$ ) 为 77603, 分别乘以 3 和 10, 再除以校准曲线的斜率( $b$ )3293049, 得到检出限和定量限分别为 0.07 和 0.23  $\mu$ g/kg。本着留有一定的余量的原则, 标准文本里把检出限和定量限分别确定为 0.15 和 0.5  $\mu$ g/kg。检测方法的定量限的确定, 一方面与检测方法本身的灵敏度有关, 另一方面低于国内外污染物限量标准。我国油脂及其制品苯并(a)芘限量为 10  $\mu$ g/kg, 欧盟为 2  $\mu$ g/kg。本次修订把定量限确定为 0.5  $\mu$ g/kg, 是欧盟污染物限量值的 25%, 是我国限量值的 5%, 完全满足食品安全风险评估与市场监管需要。

### 3.5 方法的回收率及精密度

以花生油为样品, 采用氧化铝和分子印迹 2 种净化方式进行加标实验。加标量由低到高分别为 0.5、5、15  $\mu$ g/kg 3 个水平, 它们分别是定量限、我国卫生限值的 0.5 和 1.5 倍。每个浓度水平样品平行测定 6 次。所得回收率与精密度见表 1。GB/T 27404-2008 《实验室质量控制规范食品理化检测》规定目标物在 100  $\mu$ g/kg 水平以下时, 回收率应满足 60%~120%; 目标物在 10  $\mu$ g/kg 时 RSD 小于 21%, 在 1  $\mu$ g/kg 时 RSD 小于 30%<sup>[16]</sup>。本测定方法氧化铝净化方式的回收率范围为 92.1%~93.8%, 标准偏差范围为 3.0%~6.1%; 分子印迹净化方式的回收率范围为 75.5%~92.8%, 标准偏差范围为 5.9%~9.6%。2 种净化方式的回收率精密度参数均达到 GB/T 27404-2008 要求。

研究了其他植物油品种, 某调和油、某玉米油、某葵花籽油、某菜籽油、某芝麻油经分子印迹净化处理后的平均回收率分别为 95.8%、91.6%、92.9%、96.2%、78.7%。

验证了国内其他主流品牌分子印迹柱, 在芝麻油为样品中加标水平 5  $\mu$ g/kg, 产自天津与武汉 2 个品牌的分子印迹柱, 其回收率分别为 92.4%、92.9%。

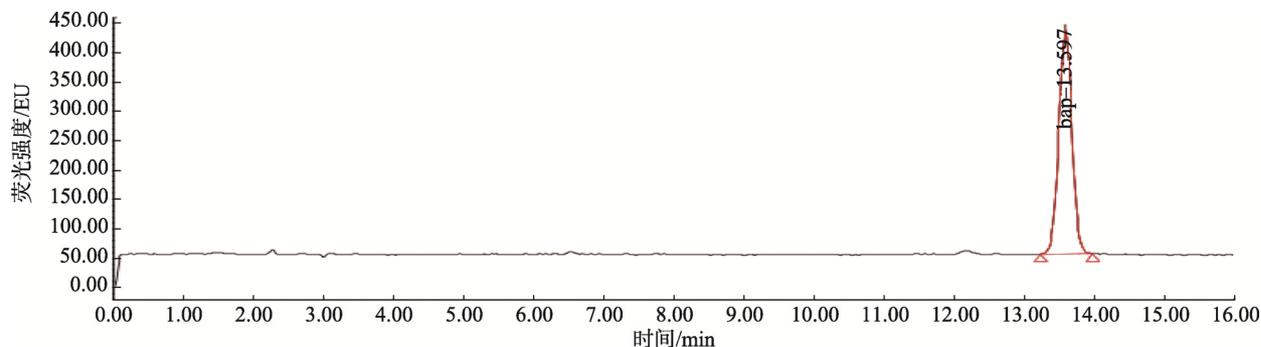


图 1 苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图

Fig.1 HPLC diagram of benzopyrene standard solution

### 3.6 方法的准确度

根据 GB/T 27404-2008 “附录 F 检测方法的确认”中“准确度”试验方法,对 FAPAS 水平测试样品“棕榈油中苯并(a)芘”(编号 T0648QC)进行平行样分析测试。质控样的真值为 0.99  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 满意值范围为 0.56~1.43  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 本试验氧化铝净化后测定值为 1.14, 分子印迹净化后测定值为 1.16, 与真值的偏差范围分别为+15%、+17%, 符合 GB/T 27404-2008 规

定的偏差范围。氧化铝与分子印迹净化处理棕榈油中苯并(a)芘质控样后的色谱图分别见图 2、3。由图可见,与国际上经典的氧化铝处理相比,分子印迹处理后色谱图杂峰较多,但杂峰在目标物质峰之前,并未影响到目标物质峰定量,且后者有机溶剂消耗量少,更环保,故首次把分子印迹柱前处理技术纳入到食品安全国家标准中,给检验人员增加一种样品处理方式。

表 1 回收率及相对标准偏差( $n=6$ )  
Table 1 Recovery and relative standard deviation ( $n=6$ )

净化方式	添加浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%						平均回收率/%	RSD/%
		1	2	3	4	5	6		
氧化铝	0.5	88.5	90.0	92.0	87.9	90.9	103	92.1	6.1
	5	85.8	91.9	92.5	91.5	91.2	93.5	91.1	3.0
	15	98.0	89.1	92.2	90.6	101	91.6	93.8	5.0
分子印迹	0.5	81.3	81.7	62.5	76.5	78.6	72.4	75.5	9.6
	5	88.4	91.4	88.6	95.5	95.5	76.6	89.3	7.7
	15	92.0	92.3	94	97.7	83.5	97.5	92.8	5.9

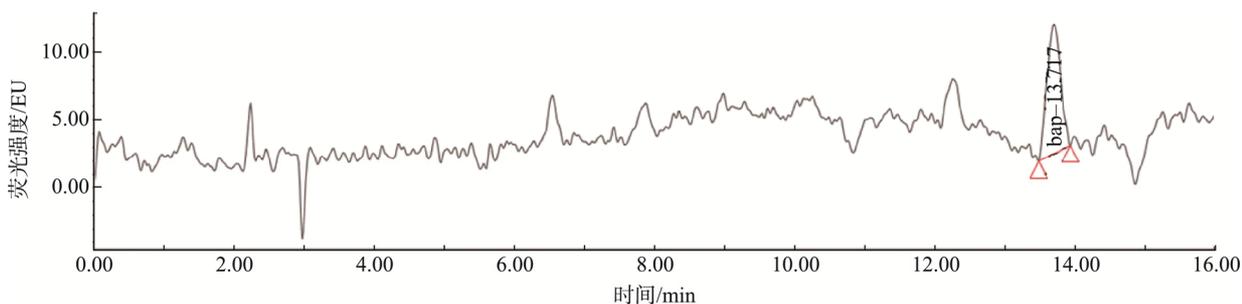


图 2 氧化铝净化处理棕榈油中苯并(a)芘质控样后的色谱图

Fig.2 Chromatogram of benzo(a)pyrene in palm oil after purification by alumina

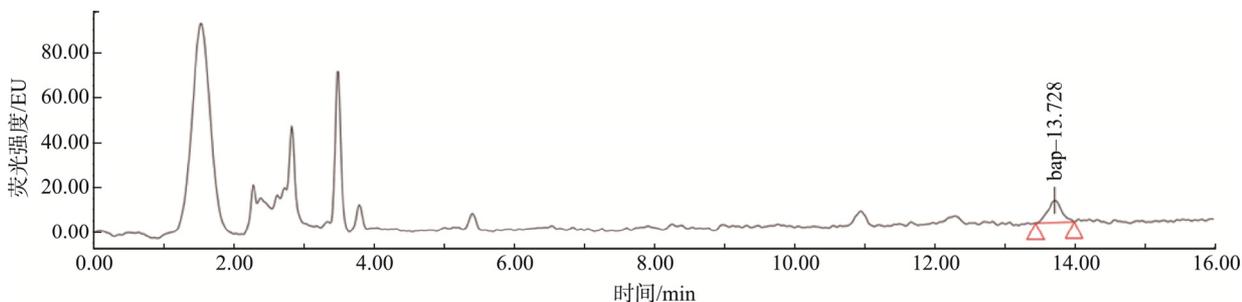


图 3 分子印迹净化处理棕榈油中苯并(a)芘质控样后的色谱图

Fig.3 Chromatogram of benzo(a)pyrene in palm oil by molecular imprinting

## 4 结论

本研究用于修订 GB/T 5009.27-2003《食品中苯并(a)芘的测定》和 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》为 GB 5009.27-2016《食品安全国

家标准 食品中苯并(a)芘的测定》。方法适用范围增加了油脂制品,删除了荧光分光光度法与目测比色法,修改采纳了高效液相色谱法,首次在国家标准中引入了分子印迹固相萃取净化方法。标准方法发布之后的跟踪评价工作未提出修改意见。

## 参考文献

- [1] 吴永宁. 食品中有机污染物检测方法标准操作程序[M]. 北京: 中国质检出版社, 2017.  
Wu YN. Standard operating procedures for testing methods for organic contaminants in food [M]. Beijing: China Quality Inspection Press, 2017.
- [2] 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-Contamination limits in food [S].
- [3] Commission Regulation (EU) No 835/2011 Maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs [S].
- [4] 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].
- [5] 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 Determination of benzo(a)pyrene of animal and vegetable fats and oil-Reversed-phase high performance liquid chromatography method [S].
- [6] 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 foods [S].
- [7] 吴刚, 强维, 彭倩. 苯并(a)芘分子印迹材料在食品中苯并芘检测中的应用[C]// 第九届全国试剂与应用技术交流会, 2015.  
Wu G, Qiang W, Peng Q. Application of benzo (a) pyrene molecular imprinted material in the detection of benzo pyrene in food [C]// The Ninth National Reagent and Application Technology Exchange, 2015.
- [8] 蔡亚岐, 牟世芬. 分子印迹固相萃取及其应用[J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 116-121.  
Cai YQ, Mou SF. Advances in molecularly imprinted solid phase extraction [J]. J Instrum Anal, 2005, 24(5): 116-121.
- [9] 田大昕. 分子印迹聚合物功能材料[M]. 北京: 科学出版社, 2019.  
Tian DT. Molecular imprinted polymer functional materials [M]. Beijing: Science Press, 2019.
- [10] 杨眉, 侯长军, 霍丹群, 等. 分子印迹固相萃取材料在痕量物质检测中的研究进展[J]. 材料导报, 2012, 26(4): 69-74.  
Yang M, Hou CJ, Huo DQ, *et al.* Development of molecular imprinted solid phase extraction on the detection for trace amounts of analytes [J]. Mater Rev, 2012, 26(4): 69-74.
- [11] Qiao FX, Sun HW, Yan HY, *et al.* Molecularly imprinted polymers for solid phase extraction [J]. Chromatographia, 2006, 64(11-12): 625-630.
- [12] Oguz C, Monireh B, Fatma Y, *et al.* Novel QCM and SPR sensors based on molecular imprinting for highly sensitive and selective detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in apple samples [J]. Mater Sci Eng C, 2019, (102): 32-42.
- [13] 谭钰清, 孙梦瑶, 刘宇婷, 等. 应用介孔分子印迹聚合物萃取粮食中的乙酰甲胺磷[J]. 分析测试学报, 2019, 38(7): 811-816.  
Tan YQ, Sun MY, Liu YT, *et al.* Extraction of acephate in grains using mesoporous molecularly imprinted polymer [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(7): 811-816.
- [14] 张圆, 李龙, 苏立强, 等. 分子印迹固相萃取光谱法快速检测猪肉中左氧氟沙星[J]. 分析化学, 2018, (5): 729-734.  
Zhang Y, Li L, Su LQ, *et al.* Rapid detection of levofloxacin in pork by molecular imprinting solid phase extraction [J]. Chin J Anal Chem, 2018, (5): 729-734.
- [15] 刘笑笑, 张菁菁, 丁辉, 等. 分子印迹-气相色谱-串联质谱法检测烤肉中的 14 种多环芳烃[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4557-4564.  
Liu XX, Zhang JJ, Ding H, *et al.* Determination of 14 kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecue by molecular imprinting-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4557-4564.
- [16] 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: 陈雨薇)

## 作者简介



滕小沛, 副主任技师, 主要研究方向为卫生理化检验。

E-mail: 584177436@qq.com



刘华良, 副研究员, 主要研究方向为食品安全检验标准。

E-mail: LHL-1@163.com