

固相萃取 - 高效液相色谱法测定 植物油中苯并[a]芘

蔡尽忠, 王集鹏, 邓 盈

(厦门华夏学院 环境与公共健康学院, 福建 厦门 361024)

摘要:建立了一种先用固相萃取法对样品进行前处理,再用高效液相色谱法测定苯并[a]芘含量的方法,同时研究了固相萃取柱的活化与重复使用。结果表明:苯并[a]芘标准曲线在0.5~10.0 μg/L范围内具有良好的线性关系,线性方程为 $y = 60\,267x + 9\,951$ ($R^2 = 0.999$);苯并[a]芘检出限为0.03 μg/kg,定量限为0.1 μg/kg,苯并[a]芘添加量在0.5~10.0 μg/kg的加标样品回收率均大于90%,变异系数小于5%。对6种不同食用油样品进行检测,本方法与国标法检测结果不存在显著差异($P > 0.05$)。固相萃取柱经乙酸乙酯简单的再活化处理后,可以重复使用。与国标法比较,本方法前处理步骤简单易操作、使用试剂量少、前处理时间短、检出限更低、方法回收率高,符合实验室和检测机构的检测需求。固相萃取柱可重复使用5次,可有效节约实验室的检测成本。

关键词:苯并[a]芘;固相萃取;高效液相色谱;植物油

中图分类号:TS225.1;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2020)03-0044-05

Determination of benzo[a] pyrene in vegetable oil by solid phase extraction and high performance liquid chromatography

CAI Jinzhong, WANG Jipeng, DENG Ying

(College of Environment and Public Health, Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024, Fujian, China)

Abstract: A method for determination of benzo[a]pyrene using high performance liquid chromatography (HPLC) after a solid phase extraction sample pretreatment was established. The activation and reuse of solid phase extraction column were also studied at the same time. The results showed that the standard calibration curve of benzo[a]pyrene had a good linear relationship in the range of 0.5–10.0 μg/L with $R^2 = 0.999$, the linear equation was $y = 60\,267x + 9\,951$. The detection limit of benzo[a]pyrene was 0.03 μg/kg and the quantitative limit was 0.1 μg/kg. The recovery of the spiked samples with dosage of benzo[a]pyrene 0.5–10.0 μg/kg was higher than 90% and the coefficient of variation was less than 5%. In the detection of six different edible oil samples, there was no significant difference between this method and the national standard method ($P > 0.05$). After a simple reactivation process using ethyl acetate, the extraction column could be reused. Compared with the national standard method, the pretreatment process of this method was simpler and easier to operate, the amount of reagents used was less, the pretreatment time was shorter, the detection limit was lower, and the recovery rate of the method was higher, which met the detection requirements of laboratories and testing organizations. Solid phase extraction column could be reused for five times, which could effectively save the testing cost of a laboratory.

column could be reused for five times, which could effectively save the testing cost of a laboratory.

Key words: benzo[a]pyrene; solid phase extraction; high performance liquid chromatography; vegetable oil

收稿日期:2019-05-29;修回日期:2019-09-19

基金项目:大学生创新创业项目(201712709007)

作者简介:蔡尽忠(1979),男,副教授,硕士,主要从事食品、环境中有毒有害物质的检测与处理工作(E-mail) cjjz@hxxy.edu.cn。

通信作者:邓 盈,高级工程师(E-mail) dengy@hxxy.edu.cn。

随着人们生活水平日渐提高,食品安全问题也

备受重视。甘肃“红色南梁”纯胡麻油苯并[a]芘超标事件以及深圳沃尔玛油炸鸡腿等反复使用“千滚油”等安全问题引发人们对苯并[a]芘的关注。苯并[a]芘(BaP)是一种由5个苯环构成的稠环芳香烃,难溶于水,具有脂溶性,性质十分稳定,是食品常见的污染物之一^[1]。苯并[a]芘是多环芳烃中毒性最强的致癌物,对实验动物的最小致癌剂量为0.4~2 μg^[2]。欧盟规定油炸食品中苯并[a]芘含量不能超过2 μg/kg^[3],我国GB 2762—2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》中规定油脂及油制品中苯并[a]芘含量不能超过10 μg/kg。

目前,国内外对于苯并[a]芘常用的检测方法有高效液相色谱法^[4-5]、气相色谱质谱联用法^[6]、荧光分光光度法等。在我国,GB 5009.265—2016《食品安全国家标准 食品中多环芳烃的测定》是现行有效检测食品中苯并[a]芘含量的标准,此标准的前处理步骤较为复杂,对操作人员的要求高,较难满足基层检测机构的需求。

本研究在国标法的基础上,用固相萃取法(SPE)对油样进行前处理,在达到传统液液萃取法检出限的基础上简化前处理方法,使苯并[a]芘在高油脂含量样品中的检测更简单。同时研究固相萃取法中萃取柱回收利用的可能性,解决固相萃取法成本高的问题,有效节约基础实验室检测的成本。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

空白样品:金龙鱼食用植物调和油(配方为大豆油49%,菜籽油21%,葵花籽油14%,玉米油9%,花生油3%,稻米油3%,芝麻油0.6%,胡麻油0.4%)。

检测样品:福临门大豆油、金龙鱼玉米油、鲁花花生油、多力葵花籽油、宝鹭菜籽油、福临门葵花籽油,均购于某超市。

20 μg/mL 苯并[a]芘标准储备液,湖北摆渡化学有限公司;环己烷(AR),乙酸乙酯(AR),乙腈(AR)。

1.1.2 仪器与设备

50 mg/3 mL 固相萃取柱,西格玛奥德里奇贸易有限公司;N-100D-W 旋转蒸发仪;LC-20A 高效液相色谱仪,岛津公司;HZ-HS-502N 电子天平;0.22 μm 有机相型微孔滤膜;MS3 涡旋混合器,德国 IKA 贸易公司。

1.2 实验方法

1.2.1 苯并[a]芘标准工作液的配制

用乙腈将苯并[a]芘标准储备液分别稀释到

0.5、1.0、3.0、5.0、8.0、10.0 μg/L,获得苯并[a]芘标准工作液(临时配制)。

1.2.2 苯并[a]芘标准曲线的制作

分别吸取苯并[a]芘标准工作液1 mL进行高效液相色谱分析,以色谱峰面积为纵坐标,苯并[a]芘质量浓度为横坐标,绘制苯并[a]芘标准曲线。

1.2.3 苯并[a]芘的检测

1.2.3.1 样品前处理

称取0.50 g油样,置于5 mL离心管中,加入600 μL环己烷萃取剂,涡旋混合30 s,充分混匀,待固相萃取净化。固相萃取操作步骤(操作过程避光):①固相萃取柱活化。用1 mL环己烷活化小柱。②上样。将待净化液上样到固相萃取柱上,然后用0.5 mL环己烷润洗样品瓶,润洗液也上样到固相萃取柱上(润洗2次)。③淋洗。用1 mL环己烷淋洗固相萃取柱。④洗脱。用1 mL乙酸乙酯洗脱并收集于鸡心瓶中(洗脱3次)。⑤浓缩、定容。将收集液用旋转蒸发器蒸发至近干(温度40℃),用乙腈定容到0.5 mL,将混合液用0.22 μm微孔滤膜过滤后装入高效液相色谱进样瓶。

1.2.3.2 高效液相色谱检测

检测条件:PAH C₁₈ 色谱柱;荧光检测器;柱温30℃;激发波长290 nm,发射波长450 nm;流速1.0 mL/min;进样量20 μL;流动相乙腈-水(体积比9:1)。

采用外标法定量。

1.2.4 方法学验证

1.2.4.1 重现性实验

取5个空白样品经过固相萃取柱前处理后,用高效液相色谱仪检测,考察方法的重现性。

1.2.4.2 加标回收率实验

称取空白样品0.50 g,置入5 mL离心管中,向离心管中添加苯并[a]芘标准工作液,添加水平为0.5、1.0、5.0、10.0 μg/kg,对加标后的样品进行固相萃取柱前处理后,采用高效液相色谱检测,重复实验2次。按下式计算加标回收率。

加标回收率 = (加标样品实测值 - 样品测量值) / 加标量 × 100%

1.2.5 与国标法比较实验

取检测样品经过固相萃取柱前处理后,分别用本方法与国标法检测,每个样品均测3个平行,检测结果以“平均值 ± 标准偏差”表示,数据用SPSS22.0软件进行差异显著性比较,考察本方法与国标法检测结果的差异。

1.2.6 固相萃取柱的使用评价

1.2.6.1 旧固相萃取柱的活化

使用过的固相萃取柱每次使用前都要进行活化处理:用 2 mL 乙酸乙酯以 1.0 mL/min 的速度过柱清洗,将柱吹干备用。

1.2.6.2 旧固相萃取柱苯并[a]芘残留分析

将新固相萃取柱和活化处理的旧固相萃取柱,分别按 1.2.3.1 固相萃取操作步骤中的固相萃取柱活化、洗脱和浓缩、定容操作后,进行高效液相色谱分析,通过对比新旧固相萃取柱的色谱图,分析旧固相萃取柱苯并[a]芘的残留情况。

1.2.6.3 旧固相萃取柱重复使用次数对加标回收率的影响

取 1.2.4.2 加标 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品,分别使用新固相萃取柱和活化处理的旧固相萃取柱按 1.2.3.1 固相萃取操作进行前处理后,采用高效液相色谱检测,分析新旧固相萃取柱对加标回收率的影响。

2 结果与分析

2.1 苯并[a]芘的标准曲线

按 1.2.2 操作,苯并[a]芘的标准曲线线性回归方程为 $y = 60\ 267x + 9\ 951$ (x 为苯并[a]芘质量浓度, $\mu\text{g}/\text{L}$; y 为色谱峰面积),在 0.5 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内具有良好的线性关系,相关系数为 0.999。

2.2 方法学验证

2.2.1 重现性(见表 1)

表 1 方法重现性实验结果

样品测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)					平均值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	变异 系数/%
1	2	3	4	5		
0.276	0.355	0.344	0.355	0.343	0.335	7.7

由表 1 可知,本方法变异系数为 7.7%。根据 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》要求,被测组分含量在 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,实验室变异系数在 30% 以内。说明本方法具有良好的重现性。

2.2.2 加标回收率

加标样品色谱图如图 1 所示,加标回收率结果如表 2 所示。

由图 1 可见,本方法苯并[a]芘出峰时间为 12.5 min,比国标法的 21.5 min 出峰时间快,节约了试剂用量,减少了仪器损耗。由表 2 可见,添加水平在 0.5 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品平均回收率在 91.7% ~ 97.3% 之间,变异系数为 1.3% ~ 4.6%,符合痕量分析(被测定组分含量小于等于 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[7])的要求。

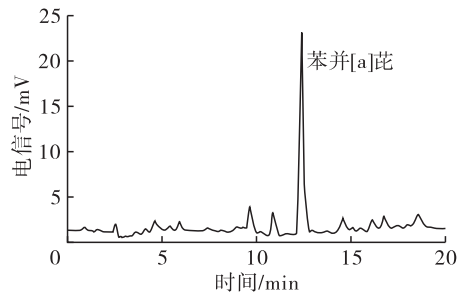


图 1 加标样品色谱图

表 2 加标回收率

添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回 收率/%	变异 系数/%
0.5	0.476	95.2	2.3
1.0	0.972	97.2	1.5
5.0	4.583	91.7	4.6
10.0	9.731	97.3	1.3

2.2.3 检出限和定量限

在空白样品中加入苯并[a]芘标准工作液进行检测,以定量离子信噪比(S/N)3 为检出限,以定量离子信噪比 10 为定量限,经计算苯并[a]芘检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法检出限远低于薛昆鹏等^[8]和金雪锋等^[9]的 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、彭小东等^[10]的 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和尹佳等^[11]的 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的检出限结果,与龙凌云等^[12]0.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的检出限相当。本方法定量限优于金雪锋等^[9]的 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和尹佳等^[11]的 0.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的定量限结果。本方法的检出限和定量限均稍差于房芳等^[13]的 0.018 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的检出限和 0.060 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的定量限结果,这可能与凝胶色谱净化法前处理效果好于固相萃取法前处理有关。

2.3 本方法与国标法比较结果

6 种不同食用油检测样品用本方法与国标法检测,结果如表 3 所示。表 3 数据经统计学分析,本方法与国标法检测结果不存在显著差异($P > 0.05$),说明本方法可用于实际食用油样品中苯并[a]芘的检测。

表 3 本方法与国标法检测结果

检测样品	本方法/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	国标法/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
福临门大豆油	1.535 \pm 0.089	1.685 \pm 0.075
金龙鱼玉米油	0.355 \pm 0.031	0.496 \pm 0.085
鲁花花生油	0.581 \pm 0.138	0.369 \pm 0.066
多力葵花籽油	0.133 \pm 0.032	未检出
宝鹭菜籽油	2.688 \pm 0.123	2.156 \pm 0.346
福临门葵花籽油	0.879 \pm 0.134	1.098 \pm 0.301

与国标法比较,本方法前处理过程得到简化,这与 Belo 等^[14]研究的前处理方法便捷性相一致,省

去了皂化等烦琐耗时的步骤。本方法与国标法的各项指标比较见表4。

表4 本方法与国标法的比较

项目	本方法	国标法
前处理过程	油样用环己烷充分溶解,通过活化的萃取柱,用环己烷淋洗,乙酸乙酯洗脱,旋转蒸发至近干,经乙腈定容后进样。	油样经正己烷溶解,经过超声、离心、重复提取等步骤,再通过活化的萃取柱,正己烷-二氯甲烷混合液洗脱,氮吹至近干,经乙腈定容后进样。
前处理时间	40 min	3.5 h
试剂使用量	10 mL左右	90 mL左右
方法检出限	0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$

由表4可见:本方法实验过程与国标法比较更加简单,且操作方便,前处理时间明显缩短,有效提高了苯并[a]芘检测的效率;从试剂使用量看,国标法试剂使用量是本方法的9倍,使用本方法能够节约实验成本,且试剂使用量较少,有利于保护环境;本方法比国标法具有更低的检出限。

2.4 固相萃取柱重复使用性

2.4.1 旧固相萃取柱中苯并[a]芘的残留

新固相萃取柱以及活化处理的旧固相萃取柱的色谱图分别见图2、图3。

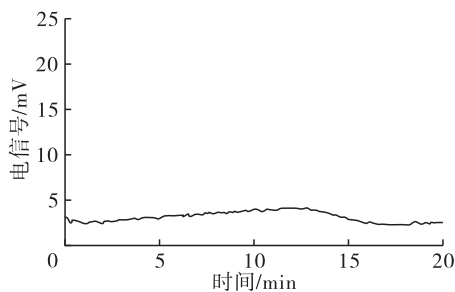


图2 新固相萃取柱色谱图

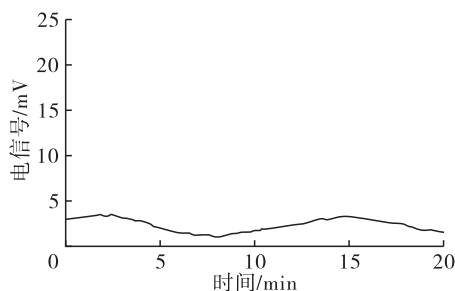


图3 活化处理的旧固相萃取柱色谱图

由图2、图3可见,旧固相萃取柱经过活化处理后,测得的洗脱液色谱图与新柱的色谱图基线基本相近,基线平稳,未见杂峰出现。说明旧固相萃取柱经过活化处理后无苯并[a]芘残留,可再次用于样

品的前处理。

2.4.2 固相萃取柱重复使用后的加标回收率

新固相萃取柱与重复使用数次的旧固相萃取柱加标回收率对比结果见表5。

表5 新、旧固相萃取柱加标回收率

新固相萃取柱		重复使用次数	旧固相萃取柱	
回收值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%		回收值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%
0.928	92.8	1	0.964	96.4
0.972	97.2	2	0.958	95.8
0.953	95.3	3	0.852	85.2
0.956	95.6	4	0.788	78.8
0.933	93.3	5	0.766	76.6

由表5可见,新固相萃取柱加标回收率在92%以上,旧固相萃取柱进行5次重复使用后,加标回收率在76.6%~96.4%之间,重复使用5次后,加标回收率还有76.6%,基本符合实验室检测要求。购买1根新的苯并[a]芘专用固相萃取柱的成本需要62.7元,而通过本文工艺活化处理的成本不到10元,重复使用1次萃取柱可节约成本40%以上,有效节约了实验室的检测成本。

3 结论

(1)根据国标法,建立了固相萃取-高效液相色谱法测定植物油中苯并[a]芘的方法。所建立方法的检出限为0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,加标回收率大于90%,变异系数小于5%,重现性好。对6种不同食用油样品进行检测,本方法与国标法检测结果不存在显著差异($P > 0.05$)。与国标法比较,本方法前处理步骤简单易操作、使用试剂量少、前处理时间短、检出限低,符合实验室和检测机构快速检测的需求。

(2)通过对固相萃取柱的苯并[a]芘残留、重复使用次数对加标回收率考察实验,证明使用该方法重新活化固相萃取柱后无苯并[a]芘残留,固相萃取柱重复使用5次,加标回收率在76.6%~96.4%之间,能够达到检测要求,有效节约实验室的检测成本。

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.
- [2] 刘建福, 喻昕, 刘德华, 等. 固相萃取和气相色谱-质谱法测定主流烟气中苯并[a]芘的研究[J]. 色谱, 2002, 20(2): 187-189.
- [3] 刘兵戈, 刘国琴, 汪学德. 植物油加工中苯并(a)芘的产生途径及控制措施[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(2): 47-51.

(下转第67页)

- Catal B Enzym, 2015, 122:117 – 124.
- [10] 李人望. 溶剂和水活度对脂肪酶 1,3 – 位置选择性和酰基转移的影响研究[D]. 北京:清华大学, 2010.
- [11] MATORI M, ASAHARA T, OTO Y. Positional specificity of microbial lipases [J]. J Ferment Bioeng, 1991, 72 (5):397 – 398.
- [12] FUREBY A M, ADLERCREUTZ P, MATTIASSON B O. Acyl migration and its implications in lipid modifications [J]. Ann New York Academy Sci, 2010, 799(1):231 – 237.
- [13] FUREBY A M, VIRTO C, ADLERCREUTZ P, et al. Acyl group migrations in 2 – monoolein[J]. Biocatal Biotransfor, 1996, 14(2):89 – 111.
- [14] JANSEEN A E M, PADT A V D, SONSBEEK H M V, et al. The effect of organic solvents on the equilibrium position of enzymatic acylglycerol synthesis [J]. Biotechnol Bioeng, 1993, 41(1):95 – 103.
- [15] KUMAR S S, ARORA N, BHATNAGAR R, et al. Kinetic modulation of *Trichosporon asahii* MSR 54 lipase in presence of organic solvents: altered fatty acid specificity and reversal of enantio selectivity during hydrolytic reactions [J]. J Mol Catal B Enzym, 2009, 59(1/2/3):41 – 46.
- [16] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. The mechanism of solvent effect on the positional selectivity of *Candida antarctica* lipase B during 1,3 – diolein synthesis by esterification[J]. Bioresour Technol, 2011, 102(23):11048 – 11050.
- [17] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. The solvent influence on the positional selectivity of Novozym 435 during 1,3 – diolein synthesis by esterification [J]. Bioresour Technol, 2009, 101(7):2568 – 2571.
- [18] DUAN Z Q, DU W, LIU D H. The pronounced effect of water activity on the positional selectivity of Novozym 435 during 1,3 – diolein synthesis by esterification[J]. Catal Commun, 2010, 11(5):356 – 358.
- [19] GUINN R M, SKERKER P S, KAVANAUGH P, et al. Activity and flexibility of alcohol dehydrogenase in organic solvents[J]. Biotechnol Bioeng, 1991, 37(4):303 – 308.
- [20] ZAKS A, KLIBANOV A. Enzyme – catalyzed processes in organic solvents[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82 (10):3192 – 3196.
- [21] SCHMITKE J L, WESCOTT C R, KLIBANOV A M. The mechanistic dissection of the plunge in enzymatic activity upon transition from water to anhydrous solvents [J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 118(14):3360 – 3365.
- [22] KURKAL V, DANIEL R M, FINNEY J L, et al. Enzyme activity and flexibility at very low hydration[J]. Biophys J, 2005, 89(2):1282 – 1287.
- [23] LÉONARD – NALÉRIE V, MARTON Z, LAMARE S. Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols [J]. J Mol Catal B Enzym, 2009, 59(1/2/3):90 – 95.
- [24] LÉONARD V, FRANSSON L, LAMARE S, et al. A water molecule in the stereospecificity pocket of *Candida antarctica* lipase B enhances enantioselectivity towards pentan – 2 – ol[J]. Chem Bio Chem, 2007, 8(6):662 – 667.
-
- (上接第 47 页)
- [4] 江露, 汪善良. 反相高效液相色谱法测定植物油中苯并芘的研究[J]. 食品科学技术学报, 2017, 35(5):91 – 94.
- [5] FAN R, RAMAGE R, WANG D, et al. Determination of ten monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid – liquid extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2012, 93(11):383 – 391.
- [6] JIRA W, ZIEGENHALS K, SPEE R K. Gas chromatography – mass spectrometry (GC – MS) method for the determination of 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and edible oils[J]. Food Addit Contam, 2008, 25(6):704 – 713.
- [7] 李建平. 高等分析化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2019.
- [8] 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.
- [9] 金雪锋, 薛昆鹏, 任兴发, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(9):2697 – 2701.
- [10] 彭小东, 王欢, 李红洲, 等. 液相萃取 – 反相高效液相色谱法联用测定植物油中的苯并芘[J]. 中国油脂, 2018, 43(10):112 – 114.
- [11] 尹佳, 余琼卫, 赵琴, 等. 固相萃取 – 高效液相色谱联用测定食用油中的 4 种多环芳烃[J]. 中国油脂, 2015, 40(3):52 – 56.
- [12] 龙凌云, 杨庆懿, 邓永琪, 等. 固相萃取 – 高效液相色谱法测定食用油中苯并(a)芘[J]. 农产品加工, 2015, 384(5):43 – 47.
- [13] 房芳, 宁晖, 邵亮亮, 等. 联用凝胶色谱净化和超高效液相色谱定量分析植物油中的苯并芘[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(9):131 – 134.
- [14] BELO R F, CNUNES C, MDOS SANTOS E V, et al. Single laboratory validation of a SPE method for the determination of PAHs in edible oils by GC – MS[J]. Anal Meth, 2012, 4(12):4068 – 4076.