

一种植物油中苯并(a)芘含量测定的固相萃取前处理方法

邹燕娣,周青燕,周双全,董慧,王燕

(道道全粮油股份有限公司,国家油菜籽加工技术研发中心,湖南岳阳414000)

摘要:为了建立一种准确性高、成本低的植物油中苯并(a)芘测定的样品前处理方法,基于GB 5009.7—2016以自制氧化铝柱为固相萃取柱,采用单因素试验对称样量、洗脱剂量、洗脱流速、吸附剂存放时间、吸附剂量这5个影响植物油中苯并(a)芘洗脱的因素进行研究,优化前处理条件,并对测定方法进行考察。结果表明:优化的前处理条件为称样量0.1000 g、洗脱剂量120 mL、吸附剂(氧化铝)量22 g、洗脱流速1滴/2 s、吸附剂存放时间少于12周;方法检出限为0.2 μg/L,样品加标回收率为94.23%~100.00%,RSD为1.20%~7.36%;同一样品测定结果与SGS测定值接近,相对平均偏差为2.36%~3.50%。说明本试验方法测定结果准确,可应用于油脂企业植物油中痕量苯并(a)芘的测定。

关键词:苯并(a)芘;植物油;前处理;固相萃取

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)07-0143-05

Solid phase extraction pretreatment method for determination of benzo (a) pyrene in vegetable oil

ZOU Yandi, ZHOU Qingyan, ZHOU Shuangquan, DONG Hui, WANG Yan

(National R&D Center for Rapeseed Processing, Daodaoquan Grain & Oil Shares Co., Ltd., Yueyang 414000, Hunan, China)

Abstract: In order to establish a pretreatment method for the determination of benzo (a) pyrene in vegetable oil with high accuracy and low cost, based on GB 5009.7 - 2016, a self-made aluminum oxide column was used as a SPE column, five factors affecting the elution of benzo (a) pyrene in oil were studied by single factor experiment, including sample amount, elution solvent dosage, elution flow rate, adsorbent storage time and adsorbent dosage, to optimize the pretreatment conditions. In addition, the detection method was evaluated. The results showed that the optimal pretreatment conditions were obtained as follows: sample amount 0.1000 g, elution solvent dosage 120 mL, adsorbent (aluminum oxide) dosage 22 g, elution flow rate 1 drop / 2 s, and adsorbent storage time not exceeding 12 weeks. The detection limit of the method was 0.2 μg/L, the recovery rate of spiked standard was 94.23% - 100.00%, and the RSD was 1.20% - 7.36%. The results of the same sample were close to those of SGS with a relative mean deviation of 2.36% - 3.50%. The above results indicated that the method was accurate and could be applied to the determination of trace benzo (a) pyrene in vegetable oil in oil enterprises.

Key words: benzo (a) pyrene; vegetable oil; pretreatment; solid phase extraction

收稿日期:2020-08-08;修回日期:2021-04-11

作者简介:邹燕娣(1985),女,工程师,硕士,主要从事油脂油料质量检测研究工作(E-mail)527488691@qq.com。

苯并(a)芘是一类具有间接强致癌作用的多环芳烃有机化合物^[1-3]。食用油作为日常生活中的必需品,其苯并(a)芘含量已成为检测机构中常见的检测项目之一。目前,国内检测植物油中苯并(a)

芘含量的前处理方法有直接溶解法^[4-5]和固相萃取法^[6-11]。固相萃取法因回收率高,具有良好的准确性而被广泛采用,GB 5009.27—2016即采用固相萃取法,其中以中性氧化铝柱或苯并(a)芘分子印迹柱进行植物油的前处理。但国标中使用的固相萃取柱价格较高,一次性中性氧化铝柱20~40元/根,一次性苯并(a)芘分子印迹柱30~60元/根,这导致国标方法检测成本高。为降低检测成本,自制氧化铝柱成为一种选择,一瓶500g的国药层析专用氧化铝的价格为12元。但自制的固相萃取柱氧化铝活性不稳定,其随着环境和时间而改变,从而增加了检测难度。基于此,本文在GB 5009.27—2016基础上对苯并(a)芘测定过程中自制氧化铝柱前处理条件进行优化,建立一种准确性高、成本低的植物油中苯并(a)芘含量测定的前处理方法,供油脂企业参考使用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

苯并(a)芘标准溶液(质量浓度4.95 μg/mL),中国计量科学研究院;试验中所用的油样均来自本公司。

石油醚(分析纯)、正己烷(色谱纯),重蒸;甲醇(色谱纯);超纯水;中性氧化铝(0.075~0.150 mm),国药层析专用。

1.1.2 仪器与设备

安捷伦1260型高效液相色谱(配有荧光检测器);RE-201型旋转蒸发器(上海越众仪器设备有限公司);HGC-12A氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);玻璃层析柱(长47 cm,内径1.5 cm),带砂芯配旋塞。

1.2 试验方法

1.2.1 色谱条件

C18色谱柱(5 μm,250 mm×4.6 mm);流动相为甲醇,流速1.0 mL/min;进样量40 μL;柱温30℃;荧光检测器参数设定为激发波长384 nm,发射波长406 nm。采用外标法定量。

1.2.2 苯并(a)芘标准储备液的配制

移取1 mL苯并(a)芘标准溶液至10 mL容量瓶中,并用甲醇稀释定容,配制成质量浓度为0.495 μg/mL的苯并(a)芘标准储备液。

1.2.3 标准曲线的绘制

将苯并(a)芘标准储备液用甲醇分别稀释得到0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL系列标准工作溶液,摇匀后过0.45 μm有机滤膜。按照1.2.1色谱

条件进样分析,以系列标准工作溶液的质量浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线。得到的标准曲线方程为 $A = 6.8964C + 0.4619$, $r = 0.9999$ 。

1.2.4 油脂质控样的配制

10.50 μg/kg质控样:准确移取2 mL苯并(a)芘标准储备液至250 mL烧瓶中,并在80℃下旋转蒸发至干后,冷却,加入94.3021 g未检出苯并(a)芘的一级菜籽油混匀后,置于260 mL油瓶中,密封干燥处保存。

0.52 μg/kg质控样:准确移取100 μL苯并(a)芘标准储备液至250 mL烧瓶中,并在80℃下旋转蒸发至干后,冷却,加入95.0021 g未检出苯并(a)芘的一级菜籽油混匀后,置于260 mL油瓶中,密封干燥处保存。

1.2.5 IV级氧化铝的制备

称取适量中性氧化铝于450℃马弗炉中煅烧12 h,冷却至室温后,称取90 g,加入10 mL超纯水进行活化,用力振摇混匀,至无结块后,置于干燥器中黑暗密封保存。

1.2.6 样品的测定

(1)氧化铝柱的装备:预先在玻璃层析柱中加入30 mL正己烷,再称取22 g IV级氧化铝转移到层析柱中,打开活塞放出溶剂,待液面离氧化铝顶层约1 cm时,关闭活塞。

(2)样品前处理:称取0.1000 g左右(精确至0.0001 g)的油样于50 mL烧杯中,加入10 mL正己烷溶解,转移至层析柱中,打开活塞,控制流速为1滴/2 s,待液面降至柱床时,分3次共加入120 mL正己烷洗脱,收集洗脱液于平底烧瓶中,旋转蒸发浓缩至近干,用3~4 mL石油醚清洗平底烧瓶,并移入2 mL样品瓶中,再重复清洗平底烧瓶2~3次,每次用石油醚2~3 mL,在氮吹仪下浓缩至近干,之后准确吸取0.2 mL甲醇到样品瓶中,上机待测。

(3)测定:按1.2.1色谱条件进行测定,带入标准曲线方程计算苯并(a)芘含量。

2 结果与分析

2.1 样品前处理过程优化

以低添加水平(0.52 μg/kg)和高添加水平(10.50 μg/kg)的质控样苯并(a)芘回收率为指标,采用单因素试验分别研究称样量、吸附剂(IV级氧化铝)量、洗脱流速、洗脱剂(正己烷)量、吸附剂存放时间(氧化铝加水活化放置24 h后算起)的影响,以优化前处理条件。

2.1.1 称样量对质控样苯并(a)芘回收率的影响

分别称取 0.52、10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样各 0.050 1、0.082 1、0.102 1、0.123 4、0.145 3、0.168 7、0.187 3 g, 在吸附剂 22 g、吸附剂存放时间 1 d、洗脱流速 1 滴/2 s 和洗脱剂 120 mL 条件下,按 1.2.6 方法进行质控样中苯并(a)芘洗脱、测定,计算质控样苯并(a)芘回收率,结果见图 1。

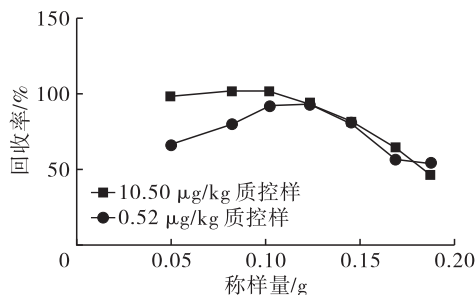


图 1 称样量对质控样苯并(a)芘回收率的影响

由图 1 可知,称样量对低添加水平和高添加水平的质控样苯并(a)芘回收率影响较大。对于 10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样,称样量越大,苯并(a)芘回收率越低,当称样量在 0.050 1、0.082 1、0.102 1、0.123 4 g 时,苯并(a)芘回收率较好,分别为 97.28%、100.30%、100.00% 和 92.00%,当称样量为 0.145 3、0.168 7、0.187 3 g 时,苯并(a)芘回收率分别为 80.60%、62.41%、45.53%。对于 0.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样,称样量为 0.050 1、0.082 1、0.102 1、0.123 4 g 时苯并(a)芘回收率呈增长趋势,分别为 65.00%、78.00%、90.00%、90.55%,当称样量为 0.145 3、0.168 7、0.187 3 g 时苯并(a)芘回收率呈降低趋势,分别为 80.60%、56.00% 和 52.65%。上述结果说明,称样量太低不利于低浓度苯并(a)芘的测定,但当称样量在 0.145 3 g 以上时,苯并(a)芘洗脱不完全,造成测定值偏低。综合考虑,选取称样量为 0.100 0 g。

2.1.2 吸附剂量对质控样苯并(a)芘回收率的影响

分别称取 5、10、15、20、22、25、30 g 吸附剂,在 0.52、10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样称样量分别为 0.100 1 g 和 0.100 5 g、吸附剂存放时间 1 d、洗脱流速 1 滴/2 s 和洗脱剂 120 mL 条件下,按 1.2.6 方法进行质控样中苯并(a)芘洗脱、测定,计算质控样苯并(a)芘回收率,结果见图 2。

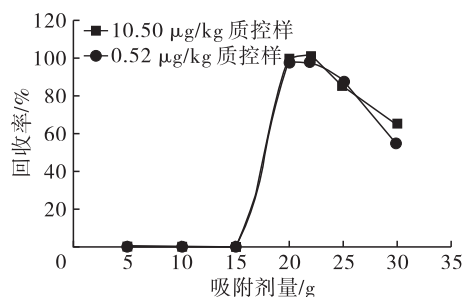


图 2 吸附剂量对质控样苯并(a)芘回收率的影响

由图 2 可知,吸附剂量对质控样苯并(a)芘回收率的影响较大。当吸附剂量在 5 ~ 15 g 时,2 个质控样苯并(a)芘回收率均为 0%。可能原因是吸附剂量太少,样品中的油脂未被吸附,被洗脱下来,不能与苯并(a)芘达到有效分离,检测时由于苯并(a)芘过少造成未检出;当吸附剂量超过 15 g 时,2 个质控样苯并(a)芘回收率升高,吸附剂量为 22 g 时,0.52、10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样的苯并(a)芘回收率均达到最高,分别为 96.80% 和 100.30%,当吸附剂量超过 22 g 时,2 个质控样的苯并(a)芘回收率呈下降趋势。可能的原因是吸附剂量太多,苯并(a)芘洗脱不完全,造成测定值偏低。因此,选择吸附剂量为 22 g。

2.1.3 洗脱流速对质控样苯并(a)芘回收率的影响

分别将洗脱流速控制为 1 滴/0.5 s、1 滴/1 s、1 滴/2 s、1 滴/3 s,在 0.52、10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样称样量分别为 0.101 8 g 和 0.100 2 g、吸附剂 22 g、吸附剂存放时间 1 d 和洗脱剂 120 mL 条件下,按 1.2.6 方法进行质控样中苯并(a)芘洗脱、测定,计算质控样苯并(a)芘回收率,结果见图 3。

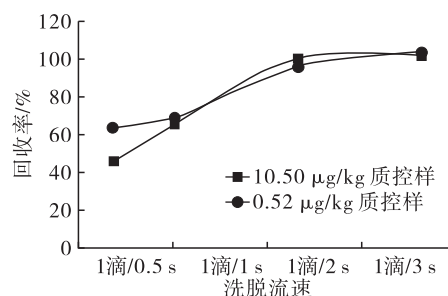


图 3 洗脱流速对质控样苯并(a)芘回收率的影响

由图 3 可知,洗脱流速越快质控样苯并(a)芘回收率越低。洗脱流速从 1 滴/0.5 s 降至 1 滴/2 s 时,0.52、10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样苯并(a)芘回收率分别从 63.50% 和 46.00% 升高到 95.60% 和 100.10%,之后,再降低洗脱流速,质控样苯并(a)芘回收率变化不大。洗脱流速太快,苯并(a)芘洗脱不完全,造成测定结果偏低;但是洗脱流速太慢会降低检测效率。因此,选择洗脱流速为 1 滴/2 s。

2.1.4 洗脱剂量对质控样苯并(a)芘回收率的影响

分别选择洗脱剂量为 60、80、100、120、140、160 mL,在 0.52、10.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 质控样称样量分别为 0.100 6 g 和 0.101 1 g、吸附剂 22 g、洗脱流速 1 滴/2 s、吸附剂存放时间 1 d 条件下,按 1.2.6 方法进行质控样中苯并(a)芘洗脱、测定,计算质控样苯

并(a)芘回收率,结果见图4。

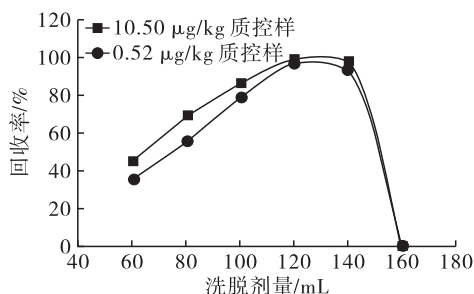


图4 洗脱剂量对质控样苯并(a)芘回收率的影响

由图4可知,随洗脱剂量的增加质控样苯并(a)芘回收率先增大后降低。当洗脱剂量为120 mL以下时,2个质控样苯并(a)芘回收率均较低;当洗脱剂量为120 mL时,2个质控样苯并(a)芘回收率均达到最高,分别为96.87% (0.50 µg/kg 质控样)和98.89% (10.50 µg/kg 质控样);当洗脱剂量超过120 mL时,质控样苯并(a)芘回收率降低。上述结果说明洗脱剂量太少,苯并(a)芘洗脱不完全,使得测定结果偏低;洗脱剂量太大,油脂被洗脱下来,不能与苯并(a)芘有效分离,导致测定结果偏低。因此,选择洗脱剂量为120 mL。

2.1.5 吸附剂存放时间对质控样苯并(a)芘回收率的影响

分别选择存放时间为1 d、1、2、4、6、8、10、12、14、16周的吸附剂,在0.52、10.50 µg/kg 质控样称样量分别为0.101 0 g和0.100 7 g、吸附剂22 g、洗脱流速1滴/2 s和洗脱剂120 mL条件下,按1.2.6方法进行质控样中苯并(a)芘洗脱、测定,计算质控样苯并(a)芘回收率,结果见图5。

由图5可知:当吸附剂存放时间少于12周时,吸附剂存放时间对质控样苯并(a)芘回收率影响较小,0.52 µg/kg或10.50 µg/kg 质控样苯并(a)芘回

收率分别在90.68%~97.69%和97.36%~100.65%之间;当存放时间超过12周时,2个质控样苯并(a)芘回收率均降低。这可能与时间过长造成吸附剂活性降低,不能有效吸附油脂,使洗脱液中油脂量过大,从而结果偏低。

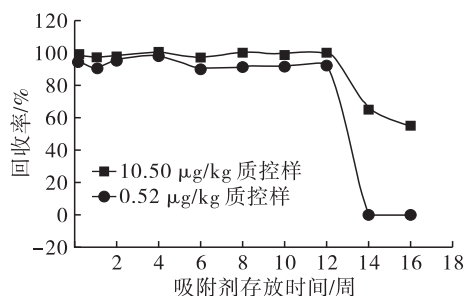


图5 吸附剂存放时间对质控样苯并(a)芘回收率的影响

综上所述,样品前处理试验优化条件为:称样量0.100 0 g,洗脱剂量120 mL,吸附剂量22 g,洗脱流速1滴/2 s,吸附剂存放时间少于12周。

2.2 仪器精密度和方法检出限

将0.5 µg/L和10.0 µg/L标准工作溶液同一天内重复测定12次并取平均值计算精密度,测得相对标准偏差为2.36%,说明仪器精密度较好。

配制不同浓度的样品加标样,按照1.2.6方法进行测定,以测定值的响应值为仪器基线响应值的3倍作为该方法的检出限,得到该方法的检出限为0.2 µg/L。

2.3 加标回收率

以不含苯并(a)芘的一级菜籽油为本底,向其中加入一定量的苯并(a)芘标准工作溶液,配制成苯并(a)芘添加量分别为0.52、1.02、5.23、10.65 µg/kg加标样,按照1.2.6方法处理样品并上机测定,每个加标样平行测定3次,计算该方法的加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表1。

表1 加标回收率测定结果

加标量/(µg/kg)	检测值/(µg/kg)				回收率/%	RSD/%
	1	2	3	平均值		
0.52	0.48	0.46	0.53	0.49	94.23	7.36
1.02	0.96	0.99	1.10	1.02	100.00	7.25
5.23	5.13	4.92	5.01	5.02	95.98	2.10
10.65	10.56	10.36	10.33	10.42	97.84	1.20

由表1可知,加标回收率为94.23%~100.00%,RSD为1.20%~7.36%。该结果表明本方法对植物油中苯并(a)芘含量测定具有良好重复性,回收率高而稳定。

2.4 样品比对

取2个不同油样各2份,一份采用本试验方法进

行测定,另外一份送至SGS测定,该机构采用的是GB 5009.27—2016方法。两者比对结果见表2。

表2 样品比对结果

油样	本方法测定结果/(µg/kg)	SGS测定结果/(µg/kg)	相对平均偏差/%
油样1	4.56	4.35	2.36
油样2	8.43	7.86	3.50

由表2可知,对同一样品,本试验方法测定结果与SGS测定结果接近,相对平均偏差为2.36%~3.50%。说明本试验方法测定结果准确,可应用于油脂企业植物油中痕量苯并(a)芘的测定。

3 结论

建立了一种植物油中苯并(a)芘含量测定的固相萃取前处理方法,以自制氧化铝柱为固相萃取柱,采用单因素试验对样品前处理过程中称样量、吸附剂量、洗脱剂量、吸附剂存放时间、洗脱流速这5个影响油脂中苯并(a)芘洗脱的因素进行研究,得到优化的前处理条件为:称样量0.1000g,洗脱剂120mL,吸附剂22g,洗脱流速1滴/2s,吸附剂存放时间少于12周。采用优化的样品前处理条件,方法检出限为0.2μg/L,样品加标回收率为94.23%~100.00%,RSD为1.20%~7.36%,同一样品测定结果与SGS测定值接近,相对平均偏差为2.36%~3.50%,说明本试验方法测定结果准确,可应用于油脂企业植物油中痕量苯并(a)芘的测定。

参考文献:

- [1] 罗皓,唐焕文,杜进林,等. 苯并(a)芘的毒性及其致癌机制研究现状[J]. 实用预防医学,2011,18(4):772-773.
- [2] 王广峰. 苯并芘对人体的危害和食品中苯并芘的来源及

防控[J]. 菏泽学院学报,2014,36(2):66-70.

- [3] 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,2008,29(5):309-311.
- [4] 吴海智,周丛,袁列江,等. 高效液相色谱法快速测定植物油中苯并芘的研究[J]. 安徽农业科学,2011(10):417-418.
- [5] 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.
- [6] 吴钟玲,何仲强,陈树东,等. 植物油中苯并芘含量测定研究[J]. 广东微量元素科学,2012,19(6):29-33.
- [7] 辛明星. 植物油脂中苯并芘测定方法的研究[J]. 农业科技与信息,2018(20):34-39.
- [8] 张晓燕,黄力,倪小英,等. 高效液相色谱法测定抽油烟机油中的苯并芘含量[J]. 粮食科技与经济,2011(6):58-59.
- [9] 郝媛媛. 高效液相色谱法测定野山茶油中苯并芘的含量[J]. 理化检验:化学分册,2018,54(7):816-818.
- [10] 梁瑞,段兰萍,黄瑞,等. 固相萃取-高效液相色谱法测定粮油中苯并芘残留[J]. 粮食科技与经济,2016,41(5):46-49.
- [11] 蒋树新,刘华良,马永建. 在线固相萃取-高效液相色谱检测植物油中的苯并(a)芘[C]//持久性有机污染物论坛2017暨第十二届持久性有机污染物学术研讨会论文集. 北京:中国化学会,2017.

(上接第132页)

进油除氧,直接蒸汽除氧。需要说明的是在处理劣质大豆油时,除了要注意脱臭温度和真空,还要重视脱色活性白土的活性影响。在管理上,对小包装油4h检测一次,散装油24h检测一次,车间每班取5L油脂检测色泽和气味。小包装容器选用PET塑料和马口铁,密封。

从生产和储存大豆油的经验看,美国大豆油的氧化稳定性好,阿根廷大豆油次之,巴西大豆油最差,国储大豆油和多年储存的大豆加工的精炼油返色返酸不同,我们掌握多数大豆油返色速率和返酸速率范围,在指导生产中控制出油色泽在Y7/R0.7、酸值(KOH)在0.05mg/g以内,如有充氮装置可向

成品油罐充氮,延缓油脂氧化速度,达到企业内控包装油标准酸值(KOH)≤0.08mg/g和色泽≤Y10/R1.3。

致谢:感谢中粮东莞粮油产业工业园刘启东高级工程师的支持!

参考文献:

- [1] 卢鑫,郑存劳,刘国权. 影响大豆油色泽的因素分析[J]. 中国油脂,2005,30(8):20-21.
- [2] 张余权,金青哲,王兴国. 油脂回色机理及影响因素研究进展[J]. 中国油脂,2014,39(5):15-18.
- [3] 左青. 大豆色拉油返色原因初探及对策[J]. 中国油脂,2000,25(6):79-81.