

高效液相色谱-荧光法测定食用油中 苯并(a)芘残留量

文永平¹, 武 怡¹, 雷英杰¹, 彭镰心², 郭添荣^{1,3}, 汪洲琼⁴, 刘文龙¹

(1. 成都大学 食品与生物工程学院, 成都 610106; 2. 农业农村部杂粮加工重点实验室, 成都 610106;
3. 成都市食品药品检验研究院, 成都 610045; 4. 巴中市产品质量检验检测中心, 四川 巴中 636000)

摘要:建立了高效液相色谱-荧光法测定食用油中苯并(a)芘残留量的方法。样品经正己烷提取、苯并(a)芘分子印迹柱净化后,进高效液相色谱仪,在RP-C18保护柱Welch C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm)、88%乙腈-水溶液为流动相、进样量10 μL条件下,用荧光检测器(激发波长384 nm,发射波长406 nm)测定食用油中苯并(a)芘含量。结果表明:该方法的苯并(a)芘线性范围为1~10 ng/mL,相关系数为0.999 91,检出限为0.2 μg/kg,平均加标回收率为94.9%。采用该方法对7种市售食用油中苯并(a)芘进行测定,结果发现,玉米胚芽油、鱼油中未检出苯并(a)芘,黑芝麻油中苯并(a)芘含量为2.780 μg/kg,胡麻籽油中苯并(a)芘含量为0.863 μg/kg,葵花仁油中苯并(a)芘含量为0.238 μg/kg,大蒜油中苯并(a)芘含量为0.410 μg/kg,五味子油中苯并(a)芘含量为0.132 μg/kg,均低于国家规定限量(10 μg/kg)。与国标法相比,该方法操作简便,节约时间,且灵敏度高、回收率稳定,适用于多种食用油中苯并(a)芘残留量的快速检测分析。

关键词:苯并(a)芘;残留;食用油;高效液相色谱;荧光检测器

中图分类号:TS225.1;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)11-0099-05

Determination of benzo(a) pyrene residues in edible oil by HPLC - fluorescence method

WEN Yongping¹, WU Yi¹, LEI Yingjie¹, PENG Lianxin²,
GUO Tianrong^{1,3}, WANG Zhouqiong⁴, LIU Wenlong¹

(1. College of Food and Bioengineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu 610106, China; 3. Chengdu Institute of Food and Drug Inspection, Chengdu 610045, China; 4. Bazhong Product Quality Inspection and Testing Center, Bazhong 636000, Sichuan, China)

Abstract: A HPLC - fluorescence method for determination of benzo(a) pyrene (BaP) residues in edible oil was established. The sample was extracted by *n*-hexane, and purified by BaP molecular imprinted column, then injected into HPLC, under the conditions of RP-C18 as protective column, Welch C18

(250 mm × 4.6 mm × 5 μm) as chromatographic column, 88% acetonitrile - aqueous as mobile phase, and sampling volume 10 μL, the residue of BaP in edible oil was determined by fluorescence detector (excitation wavelength 384 nm, emission wavelength 406 nm). The results showed that the linear range of BaP was 1 - 10 ng/mL, the correlation coefficient was 0.999 91, the detection limit was 0.2 μg/kg, and the average standard recovery rate was 94.9%. The BaP contents of seven vegetable oils on sale were determined by

收稿日期:2020-11-24;修回日期:2021-06-23

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1602101);四川省科技计划重点研发项目(2019YFN0172);四川省科技成果转移转化项目(20ZHSF0154);四川省应用基础研究计划项目(19YYJC1846);成都市科技局技术创新研发项目(2019-YF05-02192-SN);农业农村部杂粮加工重点实验室开放课题资助

作者简介:文永平(1982),男,讲师,博士,研究方向为分子生物学(E-mail)yongpwen@163.com。

通信作者:刘文龙,副教授,博士(E-mail)251082535@qq.com。

the method, and it was showed that no BaP was detected in corn germ oil and fish oil. The contents of BaP in black sesame oil, flaxseed oil, sunflower seed kernel oil, garlic oil, and *Schisandrae fructus* oil was 2.780, 0.863, 0.238, 0.410, 0.132 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively, which were lower than the national limit of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Compared with the national standard method, this method was simple, time-saving, sensitive and stable, and were suitable for the rapid detection and analysis of BaP residues in various edible oils.

Key words: benzopyrene; residual; edible oil; HPLC; fluorescence detector

苯并(a)芘(BaP)是一种无色或者浅黄色的针状晶体,其相对分子质量为252.32,熔点为179 $^{\circ}\text{C}$,沸点为475 $^{\circ}\text{C}$,不溶于水,但是溶于苯、甲苯、氯仿等有机溶剂,微溶于乙醇和甲醇^[1-2]。目前在工业上暂未发掘苯并(a)芘的应用价值,但是其对于人体具有强烈的致癌作用^[3-4]。日常饮食中残留的苯并(a)芘进入人体后,经人体细胞氧化酶的激活就会有致癌作用,由于其非常容易与DNA共价键结合,容易诱导细胞发生癌变,严重威胁着人们的生命安全^[5-8]。

近年来,关于食用油中苯并(a)芘超标问题的报道屡见不鲜。2010年8月,国内最大茶油厂生产的产品被查出苯并(a)芘含量超出国家标准6倍,不仅给企业自身带来了巨大损失,也给社会安全带来了极大危害^[9]。2014年,某市针对10个客流量较大的超市、农贸市场的53份植物油中苯并(a)芘含量进行调查发现,苯并(a)芘的检出率为75.5%,并且有含量超标现象^[10]。

食用油中苯并(a)芘来源可能是因为油料晾晒在柏油路上,晾晒过程中在高温下受到路面沥青污染。另外,油料在种植、加工环节也容易受到苯并(a)芘污染,如为了提高出油率,在压榨前对油料进行烘炒,如果温度过高,烧焦或炭化的油料可能会产生苯并(a)芘^[11-14]。我国《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762—2017)规定油脂中苯并(a)芘最大限量为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前,针对食品中苯并(a)芘的测定主要为GB 5009.27—2016《食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定》,但该方法中每个样品分析时间在30 min以上,存在操作复杂、费时、准确度低等问题^[15-16]。为此,本实验采用高效液相色谱-荧光法测定食用油中的苯并(a)芘,针对苯并(a)芘的属性及特点,在有关文献的基础上对色谱柱进行了选择,对样品前处理(提取、净化)、色谱条件进行了优化,建立了一种适用于测定

多种食用油中苯并(a)芘含量的检测方法,为食用油安全检测提供了保障。

1 材料与方法

1.1 实验材料

7种市售食用油,包括黑芝麻油、胡麻籽油、玉米胚芽油、葵花仁油、大蒜油、五味子油、鱼油,购于超市。

苯并(a)芘标准溶液(999 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Accustandard Inc.公司;正己烷、乙腈,色谱纯,成都科隆化工试剂厂;微孔滤膜、苯并(a)芘分子印迹柱,上海安谱科学仪器有限公司。

SPD-M20A/RF-20A 高效液相色谱仪-荧光检测器;THZ-92A 涡旋振荡器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;RV10DS96 旋转蒸发仪,上海锐析仪器设备有限公司;SB-5200DTDN 超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;ME203 电子天平;EPED-EZ-10TJ 超纯水仪,南京易普易达科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

苯并(a)芘标准储备液:准确吸取0.10 mL 苯并(a)芘标准溶液(999 $\mu\text{g}/\text{mL}$),用乙腈定容到100 mL 容量瓶中并超声溶解,混合均匀之后放进0~4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

苯并(a)芘标准工作液:分别吸取苯并(a)芘标准储备液10.0、20.0、40.0、80.0、100.0 μL ,用乙腈定容至10.0 mL,得到苯并(a)芘质量浓度分别为1.0、2.0、4.0、8.0、10.0 ng/mL 的苯并(a)芘标准工作液,临用时现配。

1.2.2 样品前处理

参考何旭东^[17]、王丽君^[18]等方法并作适当修改。精确称取0.50 g 试样,与5.0 mL 正己烷混合,使用涡旋振荡器旋涡混合30 s。随后转移出上清液,并使用正己烷进行重复提取,合并提取液。采

用苯并(a)芘分子印迹柱(使用前依次用5 mL二氯甲烷及5 mL正己烷活化)进行净化。将样品提取液转移进柱子,待液面降至柱床时,用10 mL正己烷淋洗柱子,弃去流出液,用5 mL二氯甲烷洗脱并收集净化液到试管中,添加1 mL乙腈以防止二氯甲烷挥发过程中带走目标物。之后将净化液在40℃下氮气吹干,吸取1 mL乙腈涡旋复溶0.5 min,过微孔滤膜后供液相色谱测定。

1.2.3 液相色谱测定参数的设定

RP-C18 保护柱(75 mm × 4.6 mm × 5 μm); Welch C18 多环芳烃色谱分析柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm),柱温 35℃; 荧光检测器,发射波长 406 nm,激发波长 384 nm; 流动相为 88% 乙腈-水溶液,流速 1.0 mL/min; 进针时间 20 min; 进样量 10 μL。

1.2.4 标准曲线的绘制与苯并(a)芘含量的计算

将系列标准工作液和样品测试液注入液相色谱仪,测定相应色谱峰,以苯并(a)芘标准工作液的质量浓度作为标准曲线的横坐标,以相应的色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,通过拟合得到标准曲线回归方程。将样品测试液的苯并(a)芘色谱峰峰面积代入标准曲线方程,按下式求得被测样中苯并(a)芘的含量。

$$\omega = C \times V/m \quad (1)$$

式中: ω 为样品中苯并(a)芘的含量, μg/kg; C 为样品测试液中苯并(a)芘的质量浓度, ng/mL; V 为样品测试液体积, mL; m 为样品测试液代表的试样质量, g。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择与标准曲线的绘制

鉴于苯并(a)芘本身为荧光物质,故采用荧光检测器进行检测,通过荧光检测器扫描得到苯并(a)芘的激发光谱和发射光谱图,确定荧光检测器的激发波长为 384 nm,发射波长为 406 nm。实验中以 RP-C18 柱为保护柱,流动相采用 88% 乙腈-水溶液,流速 1.0 mL/min,测定过程中为减少下一进针样品杂峰的干扰需使用 88% 乙腈-水溶液对 RP-C18 柱与色谱分析柱中的残留物进行冲洗。本实验经研究确定以 Welch C18 多环芳烃色谱分析柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm)分离苯并(a)芘。在选定色谱柱的情况下,对进样量进行了考察。实验发现,相较于国标法中 20 μL 的进样量,本方法采用 10 μL 的效率更高。这可能是由于食用油中苯并(a)芘含量通常较低,加大样品进样量虽然有利于提高分析灵敏度,但进样量过高时色谱峰会出现前

移或变形。实验表明,本方法在进样量为 10 μL 时分析灵敏度已能满足实际食用油样品分析的要求,因此本实验进样量设置为 10 μL。在该实验条件下,苯并(a)芘的色谱峰峰型良好,保留时间适中,符合实验需求。

经液相色谱荧光检测器测定,待仪器基线稳定后,编辑序列,将配制好的苯并(a)芘标准工作液按照质量浓度从低到高的顺序依次进样,采用峰面积外标法进行定量分析。以苯并(a)芘标准工作液的质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标,做标准曲线并得出回归方程 $Y = 4.93 \times 10^4 X + 55.58$,相关系数为 0.999 91,表明在质量浓度 1 ~ 10 ng/mL 之间苯并(a)芘质量浓度与峰面积线性关系良好。苯并(a)芘标准工作液的色谱图如图 1 所示。由图 1 可知,苯并(a)芘标准品出峰时间约为 6.88 min。

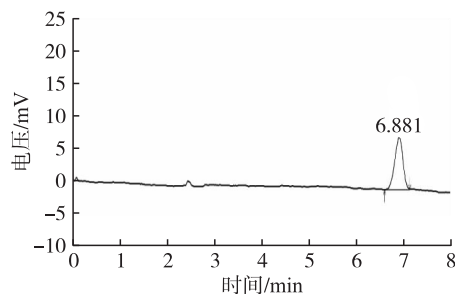


图1 苯并(a)芘标准工作液色谱图

2.2 检出限的确定

实验参考 GB 5009.27—2016 确定样品加标量和检出限,标准溶液的空白样品需进行连续稀释后,进行加标回收处理。以 3 倍信噪比峰面积响应值、取样量和进样量,确定该方法的检出限为 0.2 μg/kg。

2.3 精密度测定

为考察方法的可靠性,对实验进行精密度测定,准确吸取 2.0 ng/mL 苯并(a)芘标准工作液 10 μL,重复进样 6 次,通过 6 次平行样的峰面积计算精密度,测定结果如表 1 所示。由表 1 可知,多次进样的峰面积平均值为 99 292,精密度实验相对标准偏差为 2.66%,结果表明本方法精密度良好。

表1 精密度测定结果

标准品峰面积	平均值	相对标准偏差/%
97 063	99 292	2.66
100 033		
102 003		
98 063		
102 495		
96 093		

2.4 重复性实验

对本方法进行重复性实验检测。同一样品进行

6次重复测定,结果见表2。由表2可知,重复测定质量浓度分别为2、4、8 ng/mL的苯并(a)芘标准工作液6次,其相对标准偏差在4.31%以内,说明用本方法检测苯并(a)芘含量重复性良好。

表2 重复性实验结果

工作液质量 浓度/(ng/mL)	样品峰面积						平均峰面积	质量浓度平均值/ (ng/mL)	相对标准 偏差/%
	1	2	3	4	5	6			
2	97 063	96 033	99 315	98 063	96 495	96 093	97 177	1.97	1.33
4	196 488	185 253	188 713	188 801	195 939	204 672	193 311	3.92	3.68
8	375 154	410 014	373 967	398 269	369 630	398 284	387 553	7.86	4.31

2.5 加标回收率测定

向空白样品中添加苯并(a)芘标准溶液,加标量分别为2、4、8 ng/mL。按照1.2.2进行前处理,以1.2.3的条件进行测定,计算加标回收率,结果见表3。由表3可知,在每个加标量下进行6次重复测定的苯并(a)芘回收率在94.0%~96.5%之间,当加标量较低时,回收率较高,随着加标量的加大,

回收率相应地降低,回收率标准偏差小于等于1.4%。本方法回收率均在94%以上,平均回收率为94.9%,表明使用本实验条件下的高效液相色谱-荧光法测定食用油中苯并(a)芘含量具有较好的回收率,数据之间标准偏差较小,同一加标量下回收率差异不大,具有良好的准确性。

表3 回收率测定结果

加标量/ (ng/mL)	测定值/(ng/mL)						平均值/(ng/mL)	回收率/%	平均 回收率/%
	1	2	3	4	5	6			
2	1.91	1.96	1.93	1.94	1.92	1.94	1.93	96.5	
4	3.74	3.80	3.82	3.68	3.81	3.77	3.77	94.3	94.9
8	7.52	7.49	7.61	7.43	7.58	7.49	7.52	94.0	

2.6 实际样品测定

使用电子天平准确称取7种市售食用油样品,按照1.2.2方法对样品进行前处理,按1.2.3条件进行测定,计算食用油中苯并(a)芘含量。图2是7种食用油样品色谱图。由图2可知,黑芝麻油、胡麻籽油、葵花仁油、大蒜油和五味子油样品中,在6.815~7.238 min之间出现了苯并(a)芘吸收峰,而玉米胚芽油和鱼油样品中没有出现。

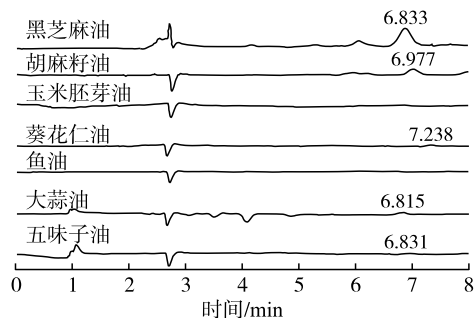


图2 7种食用油样品色谱图

表4为7种食用油中苯并(a)芘含量测定结果。由表4可知,黑芝麻油中苯并(a)芘含量最高,为2.780 μg/kg,胡麻籽油中苯并(a)芘含量为0.863 μg/kg,大蒜油中苯并(a)芘含量为0.410 μg/kg,葵花仁油中苯并(a)芘含量为0.238 μg/kg,五味子油中苯并(a)芘含量为0.132 μg/kg,玉米胚芽油和鱼油中未检出苯并(a)芘。根据GB 2762—

2017规定油脂中苯并(a)芘限量为10 μg/kg,所测定的7种市售食用油均为合格产品。

表4 7种食用油样品中苯并(a)芘含量

样品	平均含量/(μg/kg)
黑芝麻油	2.780
胡麻籽油	0.863
玉米胚芽油	未检出
葵花仁油	0.238
鱼油	未检出
大蒜油	0.410
五味子油	0.132

3 结论

针对GB 5009.27—2016《食品安全国家标准食品中苯并(a)芘的测定》存在操作复杂、费时、准确度低等问题,建立了高效液相色谱-荧光法测定食用油中苯并(a)芘的方法。样品经正己烷提取后所得提取液采用苯并(a)芘分子印迹柱净化,然后进高效液相色谱仪,在流动相为88%乙腈-水溶液,进样量为10 μL,以RP-C18柱为保护柱,Welch C18多环芳烃色谱分析柱进行分离,荧光检测器激发波长384 nm、发射波长406 nm的条件下,测定苯并(a)芘含量。通过精密测定、重复性检验和回收率测定发现,本文所建立的方法较国标法分析速度更快,检测灵敏度、准确度更高。使用该方法对7

种市售食用油中的苯并(a)芘含量进行测定,结果发现,7种市售食用油中有5种检测出了苯并(a)芘残留,2种未检出,且食用油中检出苯并(a)芘的含量均低于国家规定限量 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,均为合格产品。本方法提高了检测效率而且节约了检测成本,适用于多种食用油中苯并(a)芘残留量的快速检测分析。

参考文献:

- [1] 赵亮,牛宏亮,杨金部,等. 不同油籽生产工艺中苯并芘含量变化研究[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(4): 26-31.
- [2] 郑艺,金晨憬,何计国. 不同油脂对油炸食品中苯并(a)芘含量的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 94-100.
- [3] LI G, WU S, WANG L, et al. Concentration, dietary exposure and health risk estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in youtiao, a Chinese traditional fried food[J]. Food Control, 2016, 59: 328-336.
- [4] 王磊,樊蕊. 凝胶色谱-气质联用测定花生油中苯并芘残留[J]. 食品工业, 2019(5):322-324.
- [5] CHIOU J, LEUNG A H H, HANG W L, et al. Rapid testing methods for food contaminants and toxicants[J]. J Integr Agric, 2015, 14(11):2243-2264.
- [6] 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.
- [7] 宋炳莹,胡晓楠. 食品中苯并芘的高效液相色谱法探究[J]. 现代食品, 2019(3):145-148.
- [8] 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.

- [9] 周文华,顾燕,张波. 浅谈食用植物油中苯并(a)芘的风险管控[J]. 食品安全导刊, 2020(21):65.
- [10] 邵建波,马淑青,王丹. 潍坊市售植物油和油炸面食中苯并芘含量调查[J]. 中国城乡企业卫生, 2016, 31(1):45-47.
- [11] 黄坤,王幸平,尹佳,等. 高效液相色谱法测定大米和小麦粉中的苯并(a)芘[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(10):86-88.
- [12] 陈冬兰,石叶蓉,陈晓岚. 高效液相色谱法测定食用油中苯并(a)芘[J]. 现代农业科技, 2018(21):254,256.
- [13] SINGH L, VARSHNEY J G, AGARWAL T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food[J]. Food Chem, 2016, 199:78-81.
- [14] ROMBAUT N, SAVOIRE R, THOMASSET B, et al. Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing[J]. Ind Crop Prod, 2015, 63:26-33.
- [15] 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.
- [16] 张旭,郑睿行,鲍利锋. 高效液相色谱法快速测定烹炸油中苯并(a)芘的研究[J]. 中国食品添加剂, 2011(6):218-221.
- [17] 何旭东,李红梅. 高效液相色谱-荧光法测定食用油中苯并芘含量[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(9): 135-136.
- [18] 王丽君,禹洁,周佳,等. 分子印迹固相萃取柱-HPLC测定植物油中苯并芘[a]的含量[J]. 食品与发酵科技, 2020, 56(2):112-116.

(上接第98页)

- [18] KASTELEIN J J, VAN DER STEEG W A, HOLME I, et al. Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment [J]. Circulation, 2008, 117(23): 3002-3009.
- [19] TILLANDER V, BJORN DAL B, BURRI L, et al. Fish oil and krill oil supplementations differentially regulate lipid catabolic and synthetic pathways in mice [J/OL]. Nutr Metab (Lond), 2014, 11: 20 [2020-12-07]. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-20>.
- [20] FERRAMOSCA A, CONTE A, BURRI L, et al. A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(6): e38797 [2020-12-07]. <https://doi.org/10.1371/>

journal.pone.0038797.

- [21] IVANOVA Z, BJORN DAL B, GRIGOROVA N, et al. Effect of fish and krill oil supplementation on glucose tolerance in rabbits with experimentally induced obesity [J]. Eur J Nutr, 2015, 54(7): 1055-1067.
- [22] STORLIEN L H, KRAEGER E W, CHISHOLM D J, et al. Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats [J]. Science, 1987, 237(4817): 885-888.
- [23] TANDY S, CHUNG R W, WAT E, et al. Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia, and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(19): 9339-9345.