

食用油中苯并(a)芘分子印迹固相萃取法 测定过程中的污染溯源分析

郑耀林¹, 张树权¹, 林秋凤¹, 吴佳锋², 吴斯敏¹, 莫淑梅¹

(1. 东莞市食品药品检验所, 广东 东莞 523808; 2. 华南理工大学 化学与化工学院, 广州 510640)

摘要:对食用油中苯并(a)芘分子印迹固相萃取法测定过程中的试剂及耗材进行污染溯源分析。结果表明:分析纯试剂及一次性注射器中的橡胶是污染的主要来源,二氯甲烷(分析纯)、正己烷(分析纯)、橡胶的苯并(a)芘平均峰面积分别为0.261、0.710、2.550 mV·min,分别是国标方法检出限的0.9、2.4、8.7倍,对检测结果准确性带来严重影响。因此,提出使用高速离心替代过滤膜方式除杂以除去样液中微小颗粒物,该方案既能避免注射器带来的污染,又能保证高效液相色谱系统稳定运行,提高检验结果准确性。

关键词:苯并(a)芘;污染溯源;食用油;分子印迹固相萃取法

中图分类号:TS225.1;TQ424.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)12-0084-04

Pollution traceability in determination of benzo(a) pyrene in edible oil by molecularly imprinted solid phase extraction

ZHENG Yaolin¹, ZHANG Shuquan¹, LIN Qiufeng¹,
WU Jiafeng², WU Simin¹, MO Shumei¹

(1. Dongguan Institute for Food and Drug Control, Dongguan 523808, Guangdong, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The pollution traceability analysis of reagents and consumables used in determination of benzo(a) pyrene (BaP) in edible oil by molecularly imprinted solid phase extraction was conducted. The results showed that analytical reagent and rubber in syringe were the main sources of BaP pollution. The average peak areas of dichloromethane (analytical reagent), *n*-hexane (analytical reagent) and rubber were 0.261, 0.710 mV·min and 2.550 mV·min, respectively, which were 0.9, 2.4 times and 8.7 times of the detection limit of national standard method, bringing serious impact on the test result accuracy. Therefore, it was proposed to use high-speed centrifugation instead of filtration membrane to remove impurities in sample solution, which not only avoided the pollution caused by the syringe, but also ensured the stable operation of the liquid chromatography system to improve the accuracy of the test results.

Key words: benzo(a) pyrene; pollution traceability; edible oil; molecularly imprinted solid phase extraction

苯并(a)芘(benzo(a) pyrene, BaP)是一种由5个苯环构成的多环芳烃污染物,因其具有强烈的致

癌性、致畸性和致突变性,已被世界卫生组织确定为三大致癌物质之一^[1-2]。研究表明,BaP会对动物内脏和神经系统造成损伤,也可改变正常的细胞周期,损伤DNA,造成细胞癌变^[3-4]。

BaP广泛存在于水、空气、土壤以及煤、石油等能源物质燃烧所产生的各种烟气中^[5-6],主要通过空气、饮用水和食物等渠道进入人体,其中以食物为

收稿日期:2020-12-31;修回日期:2021-07-27

基金项目:东莞市社会发展一般项目(2020507101631)

作者简介:郑耀林(1990),男,药学(中级),硕士,研究方向为色谱分析及电分析化学(E-mail)ylzhenggroup@163.com。

主。研究表明,食品在加工过程中产生的 BaP 是构成食品污染的主要因素,对食品安全造成很大的危害^[7-8]。按照 GB 2762—2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》要求^[9],油脂及其制品中 BaP 的限量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。近年来,由 BaP 引起的食品安全问题日益突出^[10],以某品牌食用油茶籽油 BaP 超出国家标准限量 6 倍的检测报告为代表的食品安全事件引起了社会对食用油安全的高度关注。因此,不断完善食用油中 BaP 的检测方法,建立有效防治措施提升油脂的安全性成为了刻不容缓的问题^[11]。

目前,食品中 BaP 的检测方法主要有高效液相色谱法^[12]、液相色谱-质谱联用法^[13-14]、气相色谱-质谱联用法^[15]、酶联免疫吸附法^[16-17]、表面增强拉曼光谱法^[18-19]、电化学方法^[20-21]等。其中,高效液相色谱法因荧光检测器的高灵敏特性,已经被作为国标方法广泛应用于食品中 BaP 的检测^[22]。但是,由于实验环境中 BaP 的污染来源广泛^[5],检测结果极易受试剂、固相萃取柱、器皿等耗材的影响,造成检测结果假阳性,严重影响检测结果的准确度。

本研究通过对 GB 5009.27—2016 BaP 检测方法中所用的试剂、耗材等污染源进行逐一分析,寻找污染带入的原因及影响程度,探索优化检测方法,以为食品中 BaP 检验检测工作提供有益参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

苯并(a)芘标准品(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Dr. Ehrenstorfer 公司;正己烷(色谱纯),乙腈(色谱纯),二氯甲烷(色谱纯);正己烷(分析纯),来源于 A、B、C 3 个不同厂家;二氯甲烷(分析纯),来源于 A、B、C 3 个不同厂家。

苯并(a)芘分子印迹柱(500 mg/6 mL), Agela Technologies 公司;0.2 μm 有机系微孔滤膜, Ameritech 公司;1 mL 一次性注射器,来源于 a、b、c 3 个不同厂家;1.5 mL 离心管、移液枪头,艾本德公司;1 mL 一次性滴管,晟康公司;PYREX 15 mL 氮吹管。

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,赛多利斯 BSA223S 电子天平,艾本德 minispin 离心机,BUCHI R-12 平行蒸发仪,GOOJUNG Evatros T. C. S. 氮吹仪,默克 Milli-Q 超纯水机。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

称取 0.4 g 试样,加入 5 mL 正己烷,旋涡混合 0.5 min,待净化。采用苯并(a)芘分子印迹柱进行

净化,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试管中。将净化液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,准确吸取 1 mL 乙腈涡旋复溶 0.5 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液供高效液相色谱测定。

1.2.2 高效液相色谱条件

Techmate ST PAK C18-ES 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm, 5 μm);柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流动相为乙腈-水(体积比 88:12);流速 1.0 mL/min;荧光检测器,激发波长 384 nm,发射波长 406 nm;进样量 20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 试剂的影响

分别移取 5 mL 乙腈(色谱纯)、正己烷(色谱纯)、二氯甲烷(色谱纯)、正己烷 A(分析纯)、二氯甲烷 A(分析纯)于 15 mL 氮吹管,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至干,用移液枪准确吸取 1 mL 乙腈涡旋复溶 0.5 min,供高效液相色谱测定。试剂对 BaP 峰面积的影响如图 1 所示。

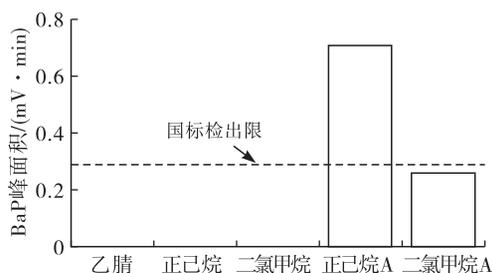
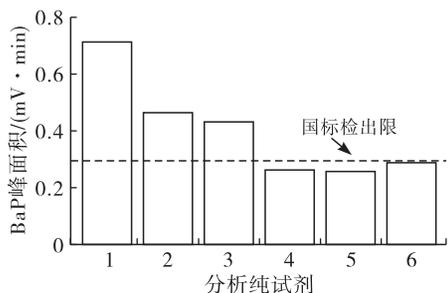


图 1 试剂的 BaP 污染情况

由图 1 可知,3 种色谱纯试剂在 BaP 出峰位置均未出现色谱峰,表明色谱纯试剂、氮吹管、移液枪头的使用均未引入污染。而两种分析纯试剂均出现明显的色谱峰,其中二氯甲烷 A(分析纯)的平均峰面积为 0.261 $\text{mV} \cdot \text{min}$,已经接近国标方法检出限的峰面积响应值(0.293 $\text{mV} \cdot \text{min}$);正己烷 A(分析纯)的平均峰面积为 0.710 $\text{mV} \cdot \text{min}$,是国标方法检出限的峰面积的 2.4 倍。

进一步分析不同厂家分析纯试剂的污染情况,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,分析纯试剂均出现了与 BaP 检出限峰面积相当的色谱峰。试剂纯度是影响检验结果准确度的关键因素,因荧光检测器的高灵敏特性,分析纯试剂中极少量的杂质也会给 BaP 的检测带来影响,极易造成假阳性。色谱纯试剂因其更严苛的提纯工艺和更低的杂质含量,满足检测要求。

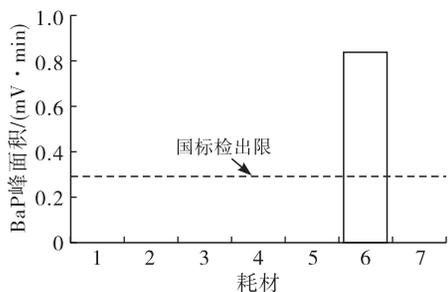


注:1. 正己烷 A;2. 正己烷 B;3. 正己烷 C;4. 二氯甲烷 A;5. 二氯甲烷 B;6. 二氯甲烷 C。

图2 不同厂家(A、B、C)分析纯试剂的 BaP 污染情况

2.2 耗材的影响

工业生产是 BaP 重要污染源之一^[23],因此本文通过分析实验耗材在乙腈中 BaP 的溶出情况,以评估耗材引入 BaP 的污染水平。将 1.5 mL 离心管、一次性滴管、移液枪头、分子印迹柱、氮吹管、一次性注射器 a、有机滤膜分别置于乙腈中浸泡 30 min,浸泡液供高效液相色谱测定,结果如图 3 所示。



注:1. 离心管;2. 一次性滴管;3. 移液枪头;4. 分子印迹柱;5. 氮吹管;6. 一次性注射器 a;7. 有机滤膜。

图3 实验耗材在乙腈中 BaP 的溶出情况

由图 3 可知,离心管、一次性滴管、移液枪头、分子印迹柱、氮吹管、有机滤膜均未发现与 BaP 保留时间一致的色谱峰,而一次性注射器的浸泡液出现了明显的色谱峰,平均峰面积为 0.840 mV·min,是国标方法检出限峰面积的 2.9 倍,表明一次性注射器是 BaP 检测的重要污染源。

将同一批号的 6 支一次性注射器 a 分别吸取乙腈浸泡 30 min,浸泡液供高效液相色谱测定,结果如图 4 所示。

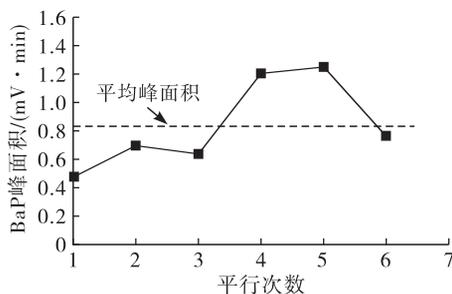


图4 一次性注射器 a 在乙腈中 BaP 的溶出情况

由图 4 可知,6 次平行实验均出现 BaP 色谱峰,且峰面积大小不一,稳定性较差,具有偶然性,给 BaP 检测结果的准确性带来严重影响。

橡胶生产过程所用填充油是多环芳烃污染的主要来源^[24-25],2005 年欧盟签署 2005/69/EC 指令,对橡胶生产所用填充油中 BaP 等多环芳烃含量做出明确限制。实验进一步评估了注射器推杆(前端为橡胶)和筒套的污染水平,将同批次的 6 支一次性注射器的推杆和筒套分离,分别置于乙腈中浸泡 30 min,浸泡液供高效液相色谱测定,结果如图 5 所示。

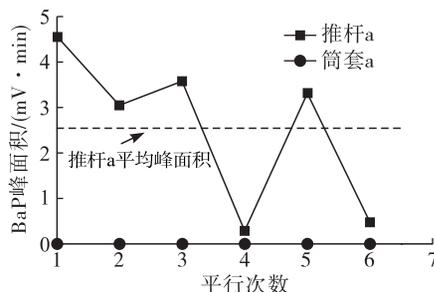


图5 注射器推杆和筒套在乙腈中 BaP 的溶出情况

由图 5 可知,6 个筒套均未发现与 BaP 保留时间一致的色谱峰,而 6 个推杆均出现 BaP 色谱峰,峰面积分别为 4.559、3.057、3.588、0.295、3.321、0.483 mV·min,平均值为 2.550 mV·min(是国标检出限的 8.7 倍),峰面积大小不一,具有偶然性,其污染水平明显高于注射器(0.840 mV·min),可能是因为注射器和推杆在使用时橡胶与乙腈的接触面积不同所致。

进一步验证不同厂家注射器推杆的 BaP 溶出情况。将 3 个厂家(a, b, c)生产的一次性注射器推杆取出,浸泡在乙腈中 30 min,浸泡液供高效液相色谱测定,结果如图 6 所示。

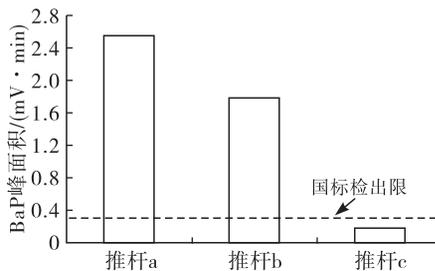


图6 不同厂家注射器推杆的 BaP 溶出情况

由图 6 可知,3 个厂家生产的一次性注射器的推杆均出现了与 BaP 保留时间一致的色谱峰,证明橡胶带来的污染具有普遍性。

2.3 方法优化

一次性注射器配合滤膜使用是色谱检测最常用的除杂手段。由于液相色谱系统对样液的颗粒杂质

要求较为严苛,样液进样前必须经过除杂处理,否则将对液相色谱系统造成不可逆的损伤,进而发生漏液、堵塞、压力不稳等问题。因此,寻找一种有效的除杂替代方法势在必行。众所周知,高速离心是异相分离的有效手段,图3已证明1.5 mL塑料离心管在乙腈中并未发生BaP溶出现象。因此,本研究提出使用高速离心(10 000 r/min离心5 min)替代过滤膜方式进行样液除杂,既能避免注射器带来污染,又能保证液相色谱系统稳定运行。经过一年时间的验证,液相色谱系统运行正常,暂未发现任何故障,进一步证明替代方案的可行性。

3 结论

对GB 5009.27—2016 BaP检测过程中所用试剂、耗材等污染源进行分析。结果表明:分析纯试剂中极少量的杂质会引入污染,而色谱纯试剂因其严苛的纯化工艺,可以有效去除污染杂质。一次性注射器推杆中的橡胶是BaP污染的主要来源,而其他耗材均未发现引入污染。因此,研究提出使用高速离心替代过滤膜的方案,既能有效避免使用注射器带来的污染,又能确保液相色谱的稳定运行。

参考文献:

- [1] 刘丽. 苯并芘对环境的影响及其检测方法研究进展[J]. 清洗世界, 2020, 36(3): 31-32.
- [2] 黄媛. 植物油中苯并(a)芘含量的快速检测方法研究[J]. 中国油脂, 2020, 45(11): 73-76.
- [3] 郑榕辉, 王重刚. 多环芳烃对鱼类生殖机能的影响[J]. 台湾海峡, 2004, 23(2): 245-252.
- [4] 管融资, 吴航利, 王佳, 等. 苯并芘污染现状及其生物毒性效应[J]. 延安大学学报(自然科学版), 2019, 38(3): 49-54.
- [5] 姚晓峰, 孙树茂. 我国环境中苯并芘监测技术研究进展[J]. 山西大同大学学报(自然科学版), 2015, 31(4): 38-40.
- [6] 余盖文, 史训旺, 黄庆德, 等. 浅析食用油脂中苯并芘的产生来源及控制措施[J]. 粮食与油脂, 2019, 32(10): 82-84.
- [7] 吴金松, 张荷丽, 陈光静, 等. 食品生产过程中常见致癌物质的成因及对策探究[J]. 现代牧业, 2018, 2(3): 39-43.
- [8] 黄丹丹, 段云鹏, 付滔, 等. 评定高效液相色谱法测定植物油中苯并芘的不确定度[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 7011-7014.
- [9] 食品安全国家标准 食品中污染物限量: GB 2762—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [10] 蔡尽忠, 王集鹏, 邓盈. 固相萃取-高效液相色谱法测定植物油中苯并[a]芘[J]. 中国油脂, 2020, 45(3): 44-47.
- [11] 孙长玲, 孙嘉彤, 胡蒋宁. 食用油中苯并(a)芘检测的样品前处理方法: 相转移催化皂化法[J]. 中国油脂, 2020, 45(11): 113-115.
- [12] 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.
- [13] 林亚楠, 李诗言, 崔益玮, 等. 分子印迹固相萃取/液-质谱联用法测定烟熏鲟鱼中苯并芘[J]. 中国食品学报, 2020, 20(3): 251-257.
- [14] 李翔宇, 舒敏, 陆姝欢, 等. LC-MS/MS检测ARA&DHA微胶囊粉剂中苯并(a)芘含量[J]. 食品工业, 2019, 40(6): 290-293.
- [15] MA T T, SHEN X F, YANG C, et al. Covalent immobilization of covalent organic framework on stainless steel wire for solid-phase microextraction GC-MS/MS determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat samples[J]. Talanta, 2019, 201: 413-418.
- [16] 史巧巧, 席俊, 陆启玉. 食品中苯并芘的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(5): 379-381.
- [17] PSCHENITZA M, HACKENBERG R, NIESSNER R, et al. Analysis of benzo[a]pyrene in vegetable oils using molecularly imprinted solid phase extraction (MISPE) coupled with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Sensors, 2014, 14(6): 9720-9737.
- [18] 丁亦男, 李蔚敏. 表面增强拉曼光谱在食品中苯并芘检测的应用[J]. 现代食品, 2016, 33(7): 83-84.
- [19] 王珊, 李忠, 潘亮, 等. 表面增强拉曼光谱(SERS)快速检测食用油中的苯并[a]芘[J]. 现代食品科技, 2017, 33(9): 271-275.
- [20] NI Y N, WANG P P, SONG H Y, et al. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene and related DNA damage using DNA/hemin/nafion-graphene biosensor[J]. Anal Chim Acta, 2014, 821: 34-40.
- [21] 孙苗, 徐文清, 王黎等. 基于共价有机骨架修饰电极的苯并芘电化学发光传感器[J]. 分析测试学报, 2020, 39(5): 577-582.
- [22] 食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定: GB 5009.27—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [23] 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.
- [24] 王玉章, 吴艳萍, 施昌智, 等. 环保型芳烃橡胶填充油抽提工艺开发与工业应用[J]. 石油炼制与化工, 2011, 42(7): 1-4.
- [25] 管翠诗, 王玉章, 丁洛, 等. 高倾点富芳烃原料生产环保橡胶填充油的技术开发[J]. 石油炼制与化工, 2013, 44(8): 33-36.