

# 全自动固相萃取净化-高效液相色谱法测定 食用植物油中苯并(a)芘含量

曾云军,汪泽生

(重庆市粮油质量监督检验站,重庆400026)

**摘要:**为提高工作效率,降低误差,建立分子印迹柱全自动固相萃取净化-高效液相色谱法测定食用植物油中苯并(a)芘含量的方法。样品经正己烷提取,采用全自动固相萃取仪进行分子印迹柱净化,C18色谱柱分离,高效液相色谱-荧光检测器检测。结果表明:苯并(a)芘在0.5~20.0 ng/mL质量浓度范围内与峰面积线性关系良好,相关系数为0.9999,方法检出限为0.09 μg/kg,定量限为0.30 μg/kg,加标回收率为91.7%~111.8%,相对标准偏差为2.0%~8.2%,与国标方法的检测结果不存在显著性差异;对市售38份食用植物油样品进行检测发现,苯并(a)芘的检出率为76.3%。该方法准确度高、重复性好,可批量自动化前处理样品,提高工作效率,并降低人员操作误差风险,适用于食用植物油中苯并(a)芘含量的测定。

**关键词:**苯并(a)芘;全自动固相萃取;食用植物油;分子印迹柱

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)04-0149-04

## Determination of benzo(a)pyrene in edible vegetable oil by automated solid phase extraction - high performance liquid chromatography

ZENG Yunjun, WANG Zesheng

(Chongqing Grain and Oil Inspection and Supervision Institute, Chongqing 400026, China)

**Abstract:** In order to improve work efficiency and reduce errors, a molecularly imprinted column automated solid phase extraction - high performance liquid chromatography method for determination of benzo(a)pyrene content in edible vegetable oil was established. The benzo(a)pyrene in samples was extracted using *n*-hexane, purified by automated solid phase extraction instrument with molecularly imprinted column, separated by C18 column and detected by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector. The results showed that benzo(a)pyrene had a good linear relationship with peak area in the range of 0.5 - 20.0 ng/mL, with a correlation coefficient of 0.9999. The limit of detection was 0.09 μg/kg, and the limit of quantitation was 0.30 μg/kg. The average recovery rate was 91.7% - 111.8% with the relative standard deviation of 2.0% - 8.2%. In the detection of edible vegetable oil, there was no significant difference between the established method and the national standard method. Afterwards, the method was applied to determine the benzo(a)pyrene content in commercial 38 edible vegetable oil samples, and the detection rate was 76.3%. In conclusion, the method is highly accurate and repeatable, and can improve the efficiency using batch automation preprocessing, reduce the risk of personnel operation error, and is suitable for the measurement of benzo(a)pyrene content in edible vegetable oil.

**Key words:** benzo(a)pyrene; automated solid phase extraction; edible vegetable oil; molecularly imprinted column

收稿日期:2022-04-08;修回日期:2022-04-18

作者简介:曾云军(1988),男,工程师,研究方向为粮油食品安全检测(E-mail)zyj0610@163.com。

苯并(a)芘是公认的强致癌物质,也是食用植物油中的主要多环芳烃污染物<sup>[1]</sup>。GB 2762-2017

《食品安全国家标准 食品中污染物限量》和 GB 5009.27—2016《食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定》分别规定了植物油中苯并(a)芘的限量(10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )和测定方法。目前,实验室应用国标方法的样品前处理多采用手动固相萃取净化方式<sup>[2-5]</sup>,存在前处理步骤复杂,批量处理能力差,费时费力,且对操作人员要求较高,人员操作引入误差风险较高等不足。全自动固相萃取仪用于样品的净化前处理,与传统手动固相萃取净化相比,实现了样品自动化批量前处理,操作简便,可提高分析效率和检验精确度,同时无须全程值守,可减少操作人员受有机试剂的伤害<sup>[6]</sup>,目前已广泛应用于农药残留<sup>[7-8]</sup>、真菌毒素<sup>[9-10]</sup>等分析的净化前处理,但应用于食用植物油中苯并(a)芘的净化前处理鲜有报道。本文在 GB 5009.27—2016 中高效液相色谱法测定苯并(a)芘含量的基础上,结合全自动固相萃取仪,建立一种分子印迹柱全自动固相萃取净化-高效液相色谱法测定植物油中苯并(a)芘含量的方法,考察其方法学性能,并对市售食用植物油样品进行批量测定,以期为食用植物油中苯并(a)芘的监测提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

食用植物油,市售;苯并(a)芘标准溶液[100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , GBW(E)082505],坛墨质检科技股份有限公司;正己烷、乙腈、二氯甲烷,色谱纯,成都市科隆化学品有限公司;Bap-3 苯并(a)芘分子印迹柱(500 mg/6 mL),天津博纳艾杰尔科技有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配荧光检测器),美国安捷伦科技仪器公司;SePRO-4 全自动固相萃取仪、MV5 全自动浓缩氮吹仪,北京莱伯泰科仪器股份有限公司;PB203-N 电子天平,梅特勒-托利多(上海)有限公司;超纯水机,英国 ELGA 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 色谱条件

C18 色谱柱(4.6 mm  $\times$  150 mm, 5  $\mu\text{m}$ );柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ;流动相为乙腈-水(体积比 88:12),流速 1.2 mL/min;荧光检测器激发波长 384 nm,发射波长 406 nm;进样量 40  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.2.2 标准溶液配制

苯并(a)芘标准中间液:准确吸取 0.50 mL 苯并(a)芘标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容,得到质量浓度为 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的苯并

(a)芘标准中间液。

苯并(a)芘标准使用液:准确吸取 2.5 mL 苯并(a)芘标准中间液(1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )于 50 mL 容量瓶中,用乙腈定容,得到质量浓度为 50 ng/mL 的苯并(a)芘标准使用液。

苯并(a)芘系列标准工作溶液:分别准确吸取 0.1、0.2、1.0、2.0、4.0 mL 苯并(a)芘标准使用液于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,得到 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 的苯并(a)芘系列标准工作溶液,现用现配。

#### 1.2.3 标准曲线的绘制

将苯并(a)芘系列标准工作溶液进高效液相色谱仪在 1.2.1 色谱条件下进行测定,以苯并(a)芘质量浓度( $X$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线。

#### 1.2.4 样品前处理

提取:称取 0.4 g(精确至 0.001 g)混匀的食用植物油试样于 10 mL 离心管中,加入 5.0 mL 正己烷,涡旋混匀,待净化。

全自动固相萃取净化:将待净化液按全自动固相萃取仪设定的程序进行净化(具体步骤见表 1)。净化液于 40  $^{\circ}\text{C}$  下氮气吹干,加入 0.4 mL 乙腈涡旋复溶,微孔滤膜过滤后待测。

表 1 全自动固相萃取净化步骤

序号	步骤	溶剂	体积/mL	流速/ (mL/min)	干燥 时间/s
1	活化	二氯甲烷	5	3	5
2	活化	正己烷	5	3	0
3	洗针	正己烷			
4	上样	待净化液	全部待 净化液	3	3
5	洗针	正己烷			
6	清洗样品管	正己烷	3	3	
7	淋洗	正己烷	6	3	10
8	洗脱	二氯甲烷	6	3	10

国标方法净化:按 GB 5009.27—2016 中 5.1.3 油脂及其制品的净化方法 2 手动净化样品。

#### 1.2.5 样品苯并(a)芘含量测定

对前处理后的样品进高效液相色谱仪在 1.2.1 色谱条件下测定苯并(a)芘色谱峰面积,代入标准曲线方程中计算苯并(a)芘含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固相萃取柱的选择

GB 5009.27—2016 对食用植物油样品的净化前处理推荐了经典的中性氧化铝小柱净化法和相

对较新的苯并(a)芘分子印迹柱净化法。通过比较,在获得良好净化效果的前提下,分子印迹柱净化法消耗的有机试剂量远小于中性氧化铝小柱净化法,这与揭平权<sup>[2]</sup>、刘孝英<sup>[3]</sup>、郝媛媛<sup>[11]</sup>等的研究结果类似。综合考虑,选用苯并(a)芘分子印迹柱作为净化柱。

## 2.2 全自动固相萃取净化条件优化

参考国标方法,选择6 mL正己烷为淋洗剂,6 mL二氯甲烷为洗脱剂,基本能淋洗下固相萃取柱上的杂质和完全洗脱苯并(a)芘。由于国标方法未规定上样流速和洗脱流速,且上样流速和洗脱流速也会影响苯并(a)芘的回收率,为减少上样和洗脱时间,确保上样时苯并(a)芘被分子印迹柱全部吸附,洗脱时苯并(a)芘被全部洗脱,分别考察了加标量为20 μg/kg的食用植物油在全自动固相萃取净化前处理过程中,上样流速和洗脱流速分别为1、2、3、4、5 mL/min时的苯并(a)芘回收率(其他条件参照表1)。结果显示,上样流速为1~5 mL/min时,回收率为87.6%~96.7%,洗脱流速为1~5 mL/min时,回收率为91.6%~94.6%,均符合GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》要求。综合考虑,选择上样流速和洗脱流速均为3 mL/min。采用本方法对4个样品从上样到洗脱完成的前处理时间约为25 min。

## 2.3 方法线性、检出限和定量限

按1.2.3的方法绘制苯并(a)芘质量浓度与色谱峰面积的关系曲线,结果表明,苯并(a)芘在0.5~20.0 ng/mL质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系,线性方程为 $Y = 2.8486X + 0.0624$ ,相关系数( $r$ )为0.9999。

分别以平行测定20份加标量为0.5 μg/kg的食用植物油样品的峰面积标准偏差的3倍和10倍,除以校准曲线的斜率<sup>[12]</sup>,得到方法检出限和定量限分别为0.09 μg/kg和0.30 μg/kg,低于GB 5009.27—2016的检出限(0.2 μg/kg)和定量限(0.5 μg/kg)要求,能满足实际检测需要。

## 2.4 方法回收率及精密度

选取空白菜籽油、大豆油、玉米油、葵花籽油按照本方法进行加标试验,加标量分别为0.5、5.0、15.0 μg/kg(分别是国标定量限、我国植物油安全限量值的0.5倍和1.5倍),每个水平的加标样品平行测定6次,结果见表2。

由表2可知,样品的加标回收率和精密度

(RSD)分别为91.7%~111.8%和2.0%~8.2%,均达到GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》要求。

表2 常见食用植物油加标回收率和精密度( $n=6$ )

食用植物油	加标量/ (μg/kg)	测定平均值/ (μg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
菜籽油	0.5	0.544	108.8	7.2
	5.0	4.866	97.3	3.7
	15.0	13.748	91.7	2.7
大豆油	0.5	0.511	102.2	5.5
	5.0	4.889	97.8	5.8
	15.0	14.421	96.1	3.1
玉米油	0.5	0.559	111.8	5.8
	5.0	4.736	94.7	2.9
	15.0	14.055	93.7	2.0
葵花籽油	0.5	0.503	100.6	8.2
	5.0	4.841	96.8	3.4
	15.0	13.964	93.1	2.0

## 2.5 与国标方法比对

选取菜籽油、大豆油、玉米油、花生油,分别用本方法和国标方法平行测定6次,结果见表3。采用配对 $t$ 检验法比较两种方法的检测结果是否存在显著性差异,菜籽油、大豆油、玉米油、花生油的 $t$ 值分别为0.07、1.08、1.59、1.52,均小于查表所得的 $t_{0.05,10}$ (2.23),可得本方法测定结果与国标方法无显著性差异,说明本方法具有较高的准确度和精密度。

表3 本方法与国标法检测结果( $n=6$ ) μg/kg

食用植物油	本方法	国标方法
菜籽油	1.779 ± 0.097	1.784 ± 0.149
大豆油	0.670 ± 0.050	0.707 ± 0.067
玉米油	1.451 ± 0.039	1.398 ± 0.072
花生油	1.596 ± 0.056	1.556 ± 0.032

## 2.6 实际样品的测定

采用本方法对市售38份食用植物油样品进行检测,其中菜籽油6份,大豆油3份,玉米油4份,葵花籽油4份,花生油8份,芝麻油4份,稻米油5份,橄榄油1份,红花籽油2份,山茶籽油1份,结果见表4。由表4可知,38份食用植物油样品中,29份样品检出苯并(a)芘,检出率为76.3%,38份样品苯并(a)芘含量范围为未检出~5.9 μg/kg,均未超过国标限量标准(10 μg/kg),但按欧盟法规Regulation(EC) No 835/2011的限量2 μg/kg计算,超标率为13.2%,与刘霞<sup>[4]</sup>测定食用植物油中苯并(a)芘的结果大致相同。由此可见,食用植物油中

含有一定的苯并(a)芘,这可能是由于油料在生产中受环境污染、干燥中与热解燃气接触或浸出溶剂中含有芳烃类物质等原因造成的污染<sup>[13]</sup>。因此,要加强食用植物油中苯并(a)芘的监测,确保食品安全。

表4 市售食用植物油样品苯并(a)芘含量  $\mu\text{g}/\text{kg}$

食用植物油	苯并(a)芘含量	食用植物油	苯并(a)芘含量
菜籽油	-	花生油	0.6
菜籽油	0.5	花生油	1.2
菜籽油	0.9	花生油	1.6
菜籽油	-	花生油	0.5
菜籽油	1.0	花生油	0.4
菜籽油	-	花生油	0.3
大豆油	0.7	芝麻油	4.6
大豆油	0.5	芝麻油	1.2
大豆油	0.4	芝麻油	3.0
玉米油	0.3	芝麻油	5.9
玉米油	0.5	稻米油	1.6
玉米油	-	稻米油	2.9
玉米油	1.4	稻米油	-
葵花籽油	1.3	稻米油	1.7
葵花籽油	1.4	稻米油	-
葵花籽油	1.5	橄榄油	1.3
葵花籽油	-	红花籽油	-
花生油	3.7	红花籽油	0.7
花生油	-	山茶籽油	0.4

### 3 结论

建立了全自动固相萃取净化-高效液相色谱法测定食用植物油中苯并(a)芘的方法。采用本方法对4个样品从上样到洗脱完成的前处理时间约为25 min,方法检出限为 $0.09 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 $0.30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,加标回收率为91.7%~111.8%,相对标准偏差为2.0%~8.2%,与国标方法的检测结果不存在显著性差异。该方法准确度高、重复性好、操作简便、自动化程度高,可提高工作效率,降低人员操作误差风险,提高检验精确度,减小实验人员接触有机试剂和苯并(a)芘的风险,适用于食用植物油样品中苯并(a)芘含量的测定。应用建立的方法对38份市售食用植物油样品进行检测,苯并(a)芘的检

出率为76.3%,含量范围为未检出~ $5.9 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,均未超过国标限量标准,但仍需加强对食用植物油中苯并(a)芘的监测,确保食品安全。

### 参考文献:

- [1] 刘国艳,张振芳,金青哲,等.食用植物油中苯并(a)芘来源及形成机理的研究进展[J].中国油脂,2013,38(4):53-56.
- [2] 揭平权,范晓明,陈佳炜,等.植物油中苯并( $\alpha$ )芘的净化方法比较研究[J].粮食与油脂,2017,30(6):89-90.
- [3] 刘孝英,王毅.全自动固相萃取-高效液相色谱法测定熏烤肉制品中苯并(a)芘含量[J].肉类研究,2020,34(3):63-67.
- [4] 刘霞.高效液相色谱法测定食用植物油中苯并( $\alpha$ )芘含量的研究[J].现代食品,2020(11):200-202.
- [5] 刘笑笑,苗茜,张滢,等.液相色谱法测定食用油中苯并(a)芘含量结果的不确定度评定[J].食品安全质量检测学报,2020,11(14):4920-4925.
- [6] 董娇,曹宁阳,耿鑫.全自动固相萃取-高效液相色谱测定蔬菜中灭蝇胺残留[J].现代食品,2018(4):94-98.
- [7] 徐燕,王志强,乔永青,等.自动固相萃取-气相色谱串联质谱法测定果蔬中的多组分农药残留[J].实用预防医学,2017,24(1):117-119.
- [8] 王苗,尹延震,严聃楨,等.自动固相萃取-气相色谱质谱法测定饮用水源地水中有机氯农药的研究[J].环境科学与管理,2017,42(11):141-144.
- [9] 陈宗良,周玲娜,赵静芳,等.自动固相萃取-HPLC-在线柱后光化学衍生法测定藿香正气水中黄曲霉毒素[J].中国现代应用药学,2021,38(10):1218-1221.
- [10] 吴宇,叶金,李丽,等.免疫亲和柱全自动固相萃取-高效液相色谱法测定粮油中玉米赤霉烯酮[J].中国粮油学报,2020,35(3):176-180.
- [11] 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.
- [12] 滕小沛,阮丽萍,刘华良.液相色谱法测定油脂及其制品中苯并(a)芘含量[J].食品安全质量检测学报,2019,10(20):6933-6937.
- [13] 李进伟,王兴国,金青哲.食用油中苯并(a)芘的来源、检测和控制[J].中国油脂,2011,36(6):7-11.