

在线固相萃取 - 高效液相色谱法检测食用油中 15+1 种欧盟优控多环芳烃

王春蕾^{1,2} 刘华良² 马永建^{* 1,2} 阮丽萍²

¹(东南大学公共卫生学院,南京 210009) ²(江苏省疾病预防控制中心,南京 210009)

摘 要 建立了植物油中 15+1 种欧盟优控多环芳烃的在线固相萃取-高效液相色谱-紫外/荧光(online-SPE-HPLC-UV/FLD)检测分析方法。食用油样品经异丙醇稀释定容并过滤,固相萃取柱 ChromSpher Pi (80 mm×3 mm) 在线净化,反相 C₁₈ PAH 专用柱(250 mm×4.6 mm i.d 5 μm) 分离,异丙醇、乙腈和水为流动相,梯度洗脱,紫外(220 nm)和荧光检测器检测。结果表明,15+1 种多环芳烃在相应的线性范围内峰面积与质量浓度之间线性良好($R^2 > 0.99$);检出限为 0.03~12.23 μg/kg;3 个水平加标回收率为 65.3%~110.5%;相对标准偏差为 0.1%~9.8%。

关键词 在线固相萃取;多环芳烃;高效液相色谱;食用油

1 引 言

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是普遍存在的持久性环境污染物,有机物的不完全燃烧和热分解、地质化学过程都可能产生 PAHs^[1,2]。部分 PAHs 具有致癌性和遗传毒性,没有致癌性的 PAHs 可以作为促癌剂,对人体健康造成严重危害^[3]。1979 年美国环保署(EPA)列出了 16 种优控 PAHs,2008 年欧盟食品安全局(EFSA)对食品中 PAHs 进行评估,列出了 15+1 种优控 PAHs(15+1 EU-priority PAHs),与 EPA 优控 PAHs 有 8 种相同,包含更多毒性较大的重质 PAHs,目前的检测方法大多是针对 EPA 列出的 16 种 PAHs,而对欧盟优控 PAHs 报道较少。

由于 PAHs 的亲脂性,在食用油生产、加工和运输过程中可能因环境污染或者加工不当而被污染^[4-6]。一些机构和组织也制定了相关的卫生限值,GB2762—2012 规定食用油中苯并(a)芘的含量≤10 μg/kg^[7,8],欧盟法规 No 835/2011 规定除了可可油和椰子油,其它油脂中苯并(a)芘≤2 μg/kg,4 种 PAHs(苯并(a)蒽、屈、苯并(b)荧蒽和苯并(a)芘)之和≤10 μg/kg^[9,10]。PAHs 提取方法主要有离线和在线两大类,常用的离线方法有液液萃取(LLE)^[10,11]、固相萃取(SPE)^[12,13]、凝胶渗透色谱(GPC)^[14]和供体受体复合色谱法(DACC)^[15,16]等,这些方法大多有复杂的前处理过程,费时费力,消耗大量有机溶剂;也有研究建立了基于 DACC 的在线净化方法^[17,18],但是并不能同时检测欧盟优控 PAHs。

本研究建立了检测食用油中 15+1 种欧盟优控 PAHs 的在线分析方法,采用在线固相萃取(online-SPE)净化,高效液相色谱紫外/荧光检测器(HPLC-UV/FLD)定量分析。online-SPE 的原理是基于 DACC,PAHs 是 π 电子供体,与 π 电子受体的固定相结合而被保留在固定相中。这种在线分析方法可以减少有机溶剂的使用,大大缩短分析时间。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UltiMate 3000 高效液相色谱系统(美国 Thermo 公司),配有 3400 型紫外检测器,3100 型荧光检测器;Milli-Q 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司);涡旋振荡器(德国 IKA 公司);高速冷冻离心机(德国 Sartorius 公司);分析天平(德国 Sartorius 公司)。

乙腈(ACN)、异丙醇(IPA)均为色谱纯(德国默克股份两合公司);水为超纯水;15 种欧盟优控

2015-04-14 收稿;2015-06-25 接受

本文系江苏省科技厅科技支撑计划项目(No: BE2010745)和江苏省“十二·五”科教兴卫工程(No: ZX201109)资助

* E-mail: mayongjian@ jscdc.cn

PAHs 混合标准溶液(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司): 环戊烯(c,d) 芘(cyclopenta(c,d) pyrene, CPP)、苯并(a) 蒽(Benzo(a) anthracene, BaA)、 (Chrysene, Chr)、5-甲基-1,2-苯并菲(5-methylchrysene, SMC)、苯并(b) 荧蒽(Benzo(b) fluoranthene, BbF)、苯并(j) 荧蒽(Benzo(j) fluoranthene, BbF)、苯并(k) 荧蒽(Benzo(k) fluoranthene, BbF)、苯并(a) 芘(Benzo(a) pyrene, BaP)、二苯并(a,h) 蒽(Dibenzo(a,h) anthracene, DaA)、苯并(g,h,i) 芘(Benzo(g,h,i) perylene, BgP)、茚并(1,2,3-cd) 芘(Indeno(1,2,3-cd) pyrene, IcP)、二苯并(a,ε) 芘(Dibenzo(a,ε) pyrene, DeP)、二苯并(a,h) 芘(Dibenzo(a,h) pyrene, DhP)、二苯并(a,i) 芘(Dibenzo(a,i) pyrene, DiP)、二苯并(a,l) 芘(Dibenzo(a,l) pyrene, DiP)、苯并(c) 芴(benzo(c) fluorene, BcF), 每种物质为 10 μg/mL 的 ACN 溶液。

2.2 实验方法

2.2.1 空白油样制备 称取约 40 g 食用油,加入 5% 活性炭,90℃ 旋转蒸发 2 h,离心后上层液过 0.45 μm 滤膜。称取食用油样品 4.0 g(精确至 0.01 g),用 IPA 溶解并定容至 5 mL,混匀过 0.45 μm 滤膜待测。

2.2.2 色谱条件 在线固相萃取柱 ChromSpher Pi(80 mm×3 mm, Thermo 公司),分析柱 C18 PAH 专用柱(250 mm×4.6 mm 5 μm, Waters 公司) 柱温 30℃,进样盘温度 40℃~45℃,根据油的性状进行调整,进样量 40 μL。萃取柱用 IPA、ACN 和水梯度洗脱:0~5 min,100% IPA,流速为 0.5 mL/min;5.2~7.0 min,60% ACN,流速为 0.5 mL/min;8~29 min,流速为 0;30~69 min,100% ACN,流速为 0.5 mL/min;70 min 后回到初始状态。分析柱用 ACN 和水梯度洗脱:0~5 min,60% ACN,流速为 0.5 mL/min;6~30 min,60% ACN,流速为 1.2 mL/min;30~48 min,60%~100% ACN,流速为 1.2 mL/min;48~55 min,100% ACN,流速为 1.2 mL/min;55~56 min,100% ACN,流速 1.2~2.0 mL/min,维持至 80 min;80 min 后回到初始状态。0~7 min 为萃取阶段,7~30 min 为转移阶段,30~88 min 为分析平衡阶段,分别在 7 和 30 min 处进行阀切换,具体切换通路见图 1。

3 结果与讨论

3.1 在线萃取条件优化

在线萃取采用 ChromSpher Pi 柱,运用供体与受体结合的原理进行在线净化,参考文献[19]的方法,用 IPA 上样。研究表明,用 IPA 上样流速不宜过大。国外已有的在线净化技术的上样体积较大,通常大于 100 μL,洗脱时间约为

10~12 min,运用 2 个六通阀进行切换,两根色谱柱实现分离^[18,19],过程较为复杂。本研究采用小体积上样,1 个六通阀切换,1 根色谱柱分离,可以缩短萃取时间,操作简单。采用 100% IPA 上样,去除油中大分子脂肪酸和色素物质,上样结束后切换六通阀,用 ACN-H₂O,去除多余的 IPA,过渡到分析柱的洗脱条件。分析柱的初始浓度为 60% ACN,为缩小峰宽,改善峰形,同时减少有机溶剂的使用,采用 40% ACN 进行过渡。

3.2 色谱条件优化

在实验阶段,比较 Thermo 公司和 Waters 公司的 C₁₈ PAH 专用柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),前者无法分离出最后两种物质(DiP 和 DhP),后者可以达到较好的分离效果。优化洗脱梯度和流速,采用 ACN 和水为流动相,梯度洗脱。为降低食用油的粘性,适当提高进样盘的温度,一般液态油为 40℃,对于半固体油样可以设为 45℃。考察柱温(25℃~35℃)对分离效果的影响(图 2,在 30℃ 条件下可以达到较好的分离效果。DiP 和 DhP 在色谱柱上保留较强,在不影响前 14 种物质分离的条件下,后期加大

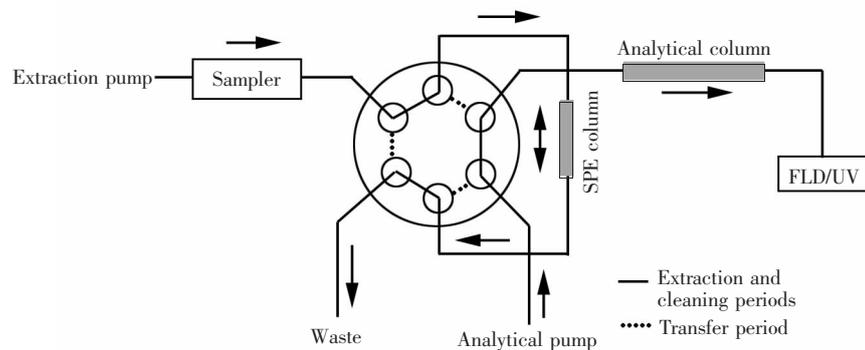


图 1 不同阶段阀切换通路

Fig.1 Column switching mechanism in different periods

流速,洗脱最后两种物质。

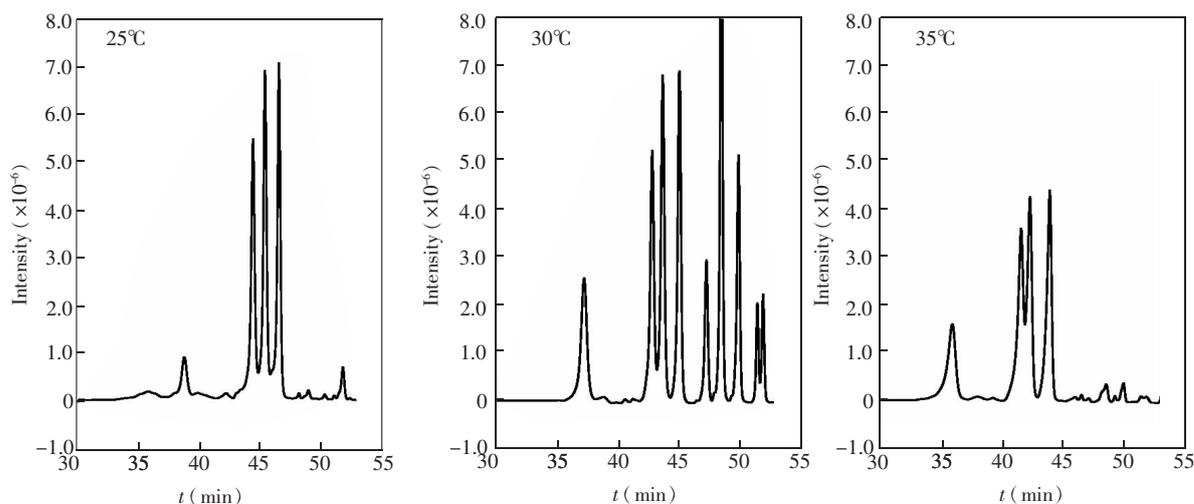


图 2 不同柱温条件下色谱图

Fig.2 Chromatograms of separation under different temperature

3.3 检测波长的选择

CCP 无荧光,用 UV 检测,波长为 220 nm; 欧盟优控的 15 种 PAHs 的最佳激发波长和发射波长不同,研究者一般采用多通道检测器,本实验室仪器无法进行多通道荧光检测,采用分时间段切换波长,具体见表 1。所得 15 种荧光 PAHs 的色谱图见图 3, CPP 无荧光性,用紫外检测器检测(见图 4)。

3.4 方法学验证

用 IPA 配制系列标准溶液,以浓度值为横坐标,平均峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,测得峰面积与质量浓度呈良好的线性关系,线性相关系数 $R^2 > 0.99$,在空白油样中进

表 1 荧光检测波长条件

Table 1 Wavelengths for fluorescence detection

Time (min)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
29.5	235	355
33.5	310	455
39	270	385
44.2	242	513
47	280	440
52.8	274	507
54	280	440
69	310	455

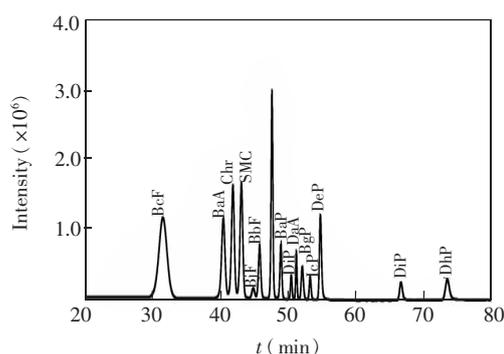


图 3 15 种 PAHs 标准混合溶液(8 ng/mL) 色谱图

Fig.3 Chromatogram of the mixed standard solution of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (8 ng/mL)

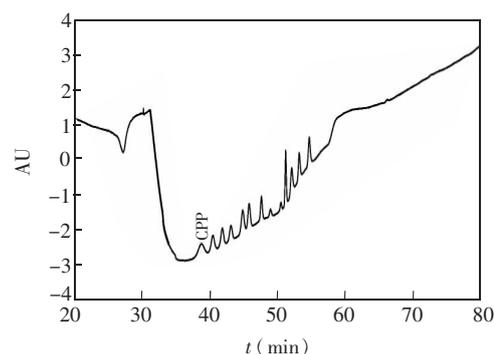


图 4 CPP(80 ng/mL) 紫外检测色谱图

Fig.4 Chromatogram of cyclopenta(c,d)pyrene (CPP) under UV detection(80 ng/mL)

行低、中、高 3 个水平加标,每水平重复测定 6 次,计算回收率和相对标准偏差,回收率为 65.25%~110.53%;相对标准偏差为 0.1%~9.8%。CPP 在 UV 上响应值较低,3 个水平回收率均不高;IcP 含 5 个苯环结构,但出峰时间较 6 环的 BgP 晚,空间构型比较特殊,可能因其特殊的空间构型导致低

浓度时在 SPE 柱上保留减弱造成回收率较低。本方法具有良好的精密度和准确性。根据 3 倍信噪比 (S/N) 确定 LOD, 10 倍 S/N 为 LOQ, 具体见表 2。

表 2 方法学验证结果

Table 2 Results of methodology validation

化合物 Compound	线性范围 Linear range (ng/kg)	线性相关系数 Correlation coefficient (R^2)	Spiking($n=6$)			检出限 LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
			Spiking level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	RSD (%)		
BcF	0.4~40	0.9994	0.5	97.2	9.8	0.30	1.0
			1	85.9	3.4		
			5	88.1	0.8		
CPP	40~1000	0.9999	50	67.1	8.9	12.23	41
			100	76.9	1.4		
			200	77.5	5.5		
BaA	0.4~40	0.9996	0.5	77.8	2.0	0.09	0.31
			1	83.6	5.0		
			5	95.3	5.0		
Chr	0.4~40	0.9997	0.5	86.3	1.2	0.07	0.22
			1	85.1	1.2		
			5	95.2	0.1		
SMC	0.4~40	0.9996	0.5	90.7	3.4	0.06	0.21
			1	86.1	1.2		
			5	96.6	0.2		
BjF	0.8~40	0.9998	1	73.3	7.3	0.30	1.0
			5	89.3	4.3		
			20	92.6	4.6		
BbF	0.4~40	0.9997	0.5	97.3	3.4	0.11	0.38
			1	93.7	1.7		
			5	98.2	0.6		
BkF	0.4~40	0.9997	0.5	97.0	2.1	0.02	0.09
			1	89.5	3.0		
			5	99.3	0.8		
BaP	0.4~16	1	0.5	82.1	4.2	0.04	0.16
			1	85.7	1.4		
			5	92.7	2.8		
DIP	0.4~16	0.9997	1	107.8	3.1	0.07	0.26
			5	106.3	1.3		
			20	103.9	1.4		
DaA	0.4~40	0.9998	0.5	97.0	2.9	0.04	0.15
			1	89.5	1.0		
			5	96.7	0.3		
BgP	0.4~16	0.9998	1	95.4	0.7	0.06	0.21
			5	81.6	2.6		
			20	78.1	3.4		
IcP	0.4~40	0.9997	0.5	65.3	9.5	0.10	0.34
			1	72.1	8.0		
			5	96.3	6.3		
DeP	0.4~16	0.9999	0.5	110.5	4.0	0.11	0.37
			1	93.6	1.5		
			5	89.6	1.6		
DiP	0.4~40	0.9955	0.5	97.3	8.1	0.15	0.5
			1	95.0	6.1		
			5	108.7	4.9		
DhP	0.4~40	0.9920	1	105.0	5.1	0.15	0.50
			5	108.5	7.1		
			20	106.4	6.8		

The full names of compounds see the text.

3.5 实际样品测定

采用本方法检测常用的大豆油、葵花籽油等共 10 种食用油中欧盟优控 15+1 种 PAHs 的含量, 结果见表 3。根据我国和欧盟关于 PAHs 的限量标准, 其中葡萄籽油中 BaP 超标 ($>10 \mu\text{g}/\text{kg}$), 葵花籽油、花生油和紫苏籽油中 BaP 超过欧盟限量 ($>2 \mu\text{g}/\text{kg}$); 葵花籽油、花生油、葡萄籽油和紫苏籽油中 BaA, Chr, BbF 和 BaP 之和 $>10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 不满足欧盟限量标准; 这 10 种油中均未检出 CPP 和 DhP。

表 3 各类油脂中 15+1 种 PAHs 的含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 3 PAHs contents in oils and fats ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

油脂 Oil and fats	BcF	CPP	BaA	Chr	SMC	BjF	BbK	BkF	BaP	DlP	DaA	BgP	IcP	DeP	DiP	DhP
大豆油(精炼一级) Bean oil (refining level)	nd	nd	1.06	1.37	0.59	nd	1.00	0.29	0.84	0.30	0.09	0.95	0.10	0.16	nd	nd
葵花籽油 Sunflower oil	0.34	nd	2.54	3.47	0.31	1.25	4.89	1.92	3.50	0.50	1.01	2.91	2.18	0.18	nd	nd
花生油(一级冷榨) peanut oil (cold squeeze level)	0.43	nd	5.34	7.60	1.32	1.58	7.73	2.76	4.91	0.34	1.69	5.40	2.90	0.21	nd	nd
玉米油 Corn oil	nd	nd	0.18	0.46	nd	nd	0.86	0.19	0.44	nd	0.15	0.54	nd	nd	nd	nd
特级初榨橄榄油 (西班牙) Extra virgin olive oil(Spain)	nd	nd	nd	1.06	1.12	nd	0.29	0.07	0.15	0.20	nd	0.10	nd	nd	nd	nd
葡萄籽油 Grape seed oil	nd	nd	83.26	10.50	115.19	4.94	8.18	0.27	22.17	nd	1.38	nd	nd	1.66	1.65	nd
食用棕榈油 (马来西亚) Palm oil (Malaysia)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.51	0.09	0.15	1.28	0.12	nd	nd	nd	1.13	nd
苏籽油(压榨一级) Organicperilla oil (squeeze level)	nd	nd	5.55	13.02	10.71	nd	10.49	3.25	5.71	nd	0.88	4.65	2.76	0.13	nd	nd
亚麻油(压榨一级) Organic flaxseed oil (squeeze level)	nd	nd	nd	0.75	0.68	0.41	0.37	0.08	0.18	nd	0.12	0.17	nd	nd	nd	nd
椰子油(菲律宾) Coconut oil (Philippines)	nd	nd	0.09	0.32	nd	nd	0.22	0.05	0.26	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: 未检出(not detected)

4 结论

建立了在线固相萃取技术检测植物油中 15+1 种欧盟优控多环芳烃的分析方法。通过优化在线萃取和分析条件, 可以实现 15+1 种物质的有效分离。本方法与常规离线方法相比操作简单, 省时省力, 灵敏度高, 重现性好, 可以满足我国和国际上对 PAHs 定量分析的要求, 并且大大减少了分析时间, 可用于日常分析。

References

- Purcaro G, Moret S, Conte L S. *Talanta*, **2012**, 105: 292-305
- Moret S, Conte L S. *J. Separ. Sci.*, **2002**, 25: 96-100
- SCF, Scientific Committee on Food, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. 4 December 2002. European Commission (EC), Brussels, **2002**
- Moret S, Dudine A, Conte L S. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **2000**, 77: 1289-1292
- Rojo Camargo M C, Antonioli P R, Vicente E. *Food Chem.*, **2012**, 135: 937-942
- ZHANG Xiao-Tao, LIU Yu-Lan, WANG Yue-Hua. *Chinese J. China Oils and Fats*, **2012**, 37(10): 45-49
张小涛, 刘玉兰, 王月华. *中国油脂*, **2012**, 37(10): 45-49
- GB2762-2012, *Maximum Levels for Contaminants in Food*. National Standards of the People's Republic of China
食品中污染物限量. 中华人民共和国国家标准. GB2762-2012

- 8 GB 2716-2005, *Hygienic Standard for Edible Vegetable Oil*. National Standards of the People's Republic of China 食用植物油卫生标准. 中华人民共和国国家标准. GB 2716-2005
- 9 Commission Regulation (EU) No 835/2011. *Amending Regulation (EC) No 1881/2006 as Regards Maximum Levels for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foodstuffs*. Official Journal of the European Union, **2011**, 19
- 10 Hossain M A, Salehuddin S M. *Arabian Journal of Chemistry*, **2012**, 5: 391-396
- 11 LI Qing-Ling, XU Xiao-Qin, LEE Sen-Chun, WANG Xiao-Ru. *Journal of Instrumental Analysis*, **2012**, 31(7): 33-37
李庆玲, 徐晓琴, 黎先春, 王小如. 分析测试学报, **2006**, 25(5): 33-37
- 12 Barranco A, Alonso-Salces R M, Bakkal A, Berrueta L A, Gallo B, Vicente F, Sarobe M. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 988: 33-40
- 13 WANG Dao-Wei, ZHAO Shi-Ming, JIN Wei, SHEN Qiu-Ying, HU Ping, HUANG Bin, PAN Xue-Jun. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2013**, 41(6): 861-868
王道玮, 赵世民, 金伟, 沈秋莹, 胡平, 黄斌, 潘学军. 分析化学, **2013**, 41(6): 861-868
- 14 WANG Feng, ZHANG Zhi-Jie, LIN Hui, CANG Yi-Peng. *Chinese J. Food Science*, **2014**, 35(6): 142-145
王峰, 张志杰, 林慧, 仓义鹏. 食品科学, **2014**, 35(6): 142-145
- 15 ZHANG Zhi-Wei, ZHU Lin, LIU Hua-Liang, MA Yong-Jian. *Chinese J. China Oils and Fats*, **2012**, 37(3): 74-77
张志玮, 朱琳, 刘华良, 马永建. 中国油脂, **2012**, 37(3): 74-77
- 16 Windal I, Boxus L, Hanot V. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1212: 16-22
- 17 van Stijn F, Kerkhoff M A T, Vandeginste B G M. *J. Chromatogr. A*, **1996**, 750: 263-273
- 18 BS EN ISO 22959: 2009. Animal and Edible Fats and Oils-Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by On-line Donor-acceptor Complex Chromatography and HPLC with Fluorescence Detection. British Standard
- 19 Barranco A, Alonso-Salces R M, Corta E, Berrueta L A, Gallo B, Vicente F, Sarobe M. *Food Chem.*, **2004**, 86(3): 465-474

Determination of 15+1 European Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Edible Oil by Online Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography

WANG Chun-Lei^{1,2}, LIU Hua-Liang², MA Yong-Jian^{1,2}, RUAN Li-Ping²

¹(School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

²(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

Abstract A novel method was developed for the determination of the 15+1 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by online solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence detection (online-SPE-HPLC-UV/FL-D). The edible oil samples were diluted with isopropyl alcohol, and then filtered. The online extraction was performed on a solid phase extraction ChromSpher Pi column (80 mm×3 mm) and the separation was carried out on a C18 reversed-phase PAH column (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) using ultraviolet detection at 220 nm and fluorescence detection. Isopropyl alcohol, acetonitrile and water were served as mobile phase in gradient elution. The results showed good linearity for the 15+1 polycyclic aromatic hydrocarbons with all the correlation coefficients (R^2) >0.99. The limits of detection (LODs) were between 0.03 and 12.23 μg/kg. The recoveries of the sixteen components in the three levels of spiked samples were in the range of 65.3%-110.5% with the relative standard deviation (RSD, $n=6$) from 0.1% to 9.8%.

Keywords Online solid phase extraction; Polycyclic aromatic hydrocarbons high performance liquid chromatography; Edible oil

(Received 14 April 2015; accepted 25 June 2015)