

凝胶渗透色谱 - 高效液相色谱联用测定 食用植物油中苯并(a)芘

郑睿行, 祝华明*, 龚鸿萍, 方芳, 张旭, 方建军

(衢州市质量技术监督检测中心, 浙江 衢州 324002)

摘要: 为建立凝胶渗透色谱-高效液相色谱联用技术测定食用植物油中苯并(a)芘残留量的分析方法, 采用凝胶渗透色谱进行样品前处理, 用反相高效液相色谱荧光法对样品中苯并(a)芘残留量进行测定, 以保留时间定性、外标法定量。结果表明, 苯并(a)芘在 0~20 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 其线性相关系数是 0.9998, 植物油样品的最低检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 加标回收率为 88.3%~94.4%, 相对标准偏差为 2.3%~4.9%。该方法灵敏度高、准确度高, 对 5 种不同浓度质控样品进行测试分析, 均获得满意结果, 说明本方法适用于食用植物油中苯并(a)芘的快速测定。

关键词: 食用植物油; 苯并(a)芘; 凝胶渗透色谱; 反相高效液相色谱

Determination of Benzo(a)Pyrene in Edible Vegetable Oils by HPLC-GPC

ZHENG Rui-hang, ZHU Hua-ming*, GONG Hong-ping, FANG Fang, ZHANG Xu, FANG Jian-jun

(Quzhou Municipal Quality and Technical Supervision and Testing Center, Quzhou 324002, China)

Abstract: A gel permeation chromatography-phase high performance liquid chromatography (GPC-HPLC) was developed to determine benzo(a)pyrene residues in edible vegetable oils. In this method, sample pretreatment was achieved using gel permeation chromatography (GPC), and benzo(a)pyrene residues in samples were determined by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with fluorescence detection using retention time for qualitative analysis and external standards for quantitative analysis. The results showed that over the range from 0 to 20 $\mu\text{g/L}$, the correlation coefficient of benzo(a)pyrene was 0.9998. The detection limit of benzo(a)pyrene in edible vegetable oil was 0.1 $\mu\text{g/kg}$. The mean spike recoveries of benzo(a)pyrene were from 88.3% to 94.4% across three spike levels with a relative standard deviation (RSDs) ranging from 2.3% to 4.9%. The sensitive and accurate method allowed the determination of benzo(a)pyrene in 5 different quality control samples with satisfying results, suggesting its good applicability in practice.

Key words: edible vegetable oil; benzo(a)pyrene; gel permeation chromatography (GPC); reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0209-04

苯并(a)芘(benzo(a)pyrene, B(a)P)^[1-3], 是一种强致癌物, 它是多环芳烃类中毒性最强的一种, 其毒性超过黄曲霉毒素。食用受其污染的食品, 已被公认具有致畸、致癌的慢性毒性。许多国家已规定其相应的膳食摄入量和食品的限量标准。按照 GB 2716—2005《食用植物油卫生标准》要求, 在食用植物油类产品中苯并(a)芘的安全限量为不超过 10 $\mu\text{g/kg}$ 。因此, 开展植物油中苯并(a)芘残留量的检测技术研究^[4-7], 对食用植物油进行科学的风险评估与监测十分必要, 对保障我国人

民群众身体健康具有积极的意义。

苯并(a)芘的检测方法已经有国标法(GB/T 22509—2008《动植物油脂: 苯并(a)芘的测定: 反相高效液相色谱法》)以及不少研究文献, 但其测定方法仍有诸多不足之处, 尤其是对样品中苯并(a)芘提取、净化与浓缩方面缺乏先进的方法^[8]。目前, 在对各类中药类样品、环境样品和食品样品进行分析时, 一般样品的萃取物中含有大量的高分子物质, 比如色素、油脂、糖类等, 造成色谱分离效率大大降低, 因此, 这类样品

收稿日期: 2010-12-17

作者简介: 郑睿行(1982—), 男, 助理工程师, 硕士研究生, 研究方向为食品质量安全检测。E-mail: ruixing161@hotmail.com

* 通信作者: 祝华明(1961—), 男, 高级工程师, 本科, 研究方向为食品质量安全检测。E-mail: zhm321321@163.com

必须进行有效的净化。凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)^[9-10]作为样品净化的手段之一,已被证明是一种使用最为方便快捷的样品净化技术。这种净化技术在国外已经得到较为广泛的应用,可高效地从有机物样品中除去高分子质量的干扰化合物,如油脂、多糖、聚合物、色素和蛋白质等,它的全密闭系统可以避免样品挥发,确保样品有效分离,同时也保护了操作人员的安全和实验室环境的安全^[11-13]。

本研究将采用全自动凝胶渗透色谱仪对食用植物油样品进行提取、净化并定量浓缩,然后用反相高效液相色谱-荧光法对 GPC 处理后的样品进行分析与研究,达到建立一种检测植物油中苯并(a)芘残留量的准确度高、灵敏度好且快速稳定的方法。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

食用植物油 浙江东茶股份有限公司。

苯并(a)芘标准品(纯度≥99%) 国家标准物质中心;乙腈(HPLC 纯)、环己烷(农残级)、乙酸乙酯(农残级) 美国 J. T. Baker 公司;高纯氮(纯度≥99.999%) 浙江巨化股份有限公司;水为去离子纯净水。

1200 型高效液相色谱仪(配荧光检测器)、Eclipse PAH 多环芳烃分析色谱柱(4.6mm × 250mm, 5μm) 美国安捷伦科技公司;GPC-全自动定量浓缩仪(内装 Bio-Beads、Type S-X3 填料的净化柱, 500mm × 25mm) 德国 LC Tech 公司;110BS 系列电子天平 北京赛多利斯天平有限公司;KL[®] 512 型氮吹仪 美国 Organomation 公司。

1.2 方法

1.2.1 反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)检测条件的选择

高效液相色谱仪(配荧光检测器);色谱柱为 Eclipse PAH 多环芳烃分析柱(4.6mm × 250mm, 5μm);流动相为乙腈-水(92:8, V/V);激发波长 384nm(狭缝 10nm), 发射波长 406nm(狭缝 10nm);流速为 1.2mL/min;柱温为 25℃;进样量为 10μL。

1.2.2 GPC 的净化浓缩条件选择^[14]

1.2.2.1 净化样品量的选择

分别称取 0.4、0.8、1.2g、1.6g 食用植物油样品,食用植物油中加入 10mL 环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)进行提取,结果表明,当净化样品量为 0.4g 时不能满足仪器的方法检出限要求;当净化样品量在 0.8~1.2g 时能够达到添加回收标准且能满足仪器的检测要求;当净化样品量大于 1.2g 时,基质干扰大,净化效果不理想。因此净化样品量宜在 0.8~1.2g 之间。

1.2.2.2 其他净化浓缩条件的选择

GPC-全自动定量浓缩仪。样品定量环:5.0mL;流速:5mL/min;油浴温度:40℃;循环冷却水温度:4.0℃;前运行时间:1300s;脱尾时间:300s;主收集时间:1200s;样品收集体积:1500μL;真空参数(阶段1 压力为 180mbar,阶段2 压力为 200mbar)。

1.2.3 标准工作溶液配制以及样品前处理^[15-18]

1.2.3.1 标准工作溶液的配制

苯并(a)芘标准储备溶液:准确称取 25mg 苯并(a)芘于 50mL 容量瓶中,用甲苯溶解,定容。此溶液约含苯并(a)芘 0.5mg/mL,4℃避光保存,至少 6 个月内分散溶液稳定。标准工作液:用苯并(a)芘标准储备溶液配制质量浓度为 1、2.5、5、10、20μg/L 的苯并(a)芘标准溶液。

1.2.3.2 样品前处理

准确称取油样 0.8g(精确到 0.0001g),置于 10mL 容量瓶中,用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)溶解并定容至 10mL,剧烈摇匀,转移至 16mL 进样瓶中。通过 GPC 二联机模式对样品进行净化,净化后浓缩,用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)定容至 2mL,最后收集 1500μL 洗脱液到玻璃样品瓶中,待检。

1.2.4 RP-HPLC 分析检测

将 GPC 收集的洗脱液用氮气吹至近干,然后向玻璃样品瓶中注入 750μL 乙腈,小心涡旋溶解残渣,避免样品瓶盖与溶剂接触。然后将 10μL 试样液注入高效液相色谱仪进行测定。

2 结果与分析

2.1 线性关系及检出限

按选定的色谱条件对苯并(a)芘标准系列浓度进行 RP-HPLC 分析,以保留时间定性,以峰面积对浓度绘制工作曲线图,由工作曲线图可知,在 0~20μg/L 范围内,苯并(a)芘线性回归方程为 $y = 1.0779x + 0.0471$,线性相关系数 r^2 为 0.9998。连续 11 次进空白样,以基线 3 倍噪声值在标准曲线查得结果,并通过计算得出植物油样品的方法检出限为 0.1μg/kg。

2.2 RP-HPLC 对样品中苯并(a)芘的确证

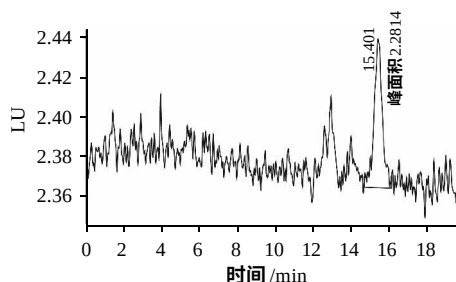


图1 植物油样品的 RP-HPLC 色谱图

Fig.1 RP-HPLC chromatogram of blank vegetable oil sample

图1出现保留时间为15.401min的洗脱峰,与苯并(a)芘标准品即RP-HPLC色谱峰的保留时间15.358min相比,相对标准偏差小于5%,表明图2中对应的色谱峰可能为苯并(a)芘。

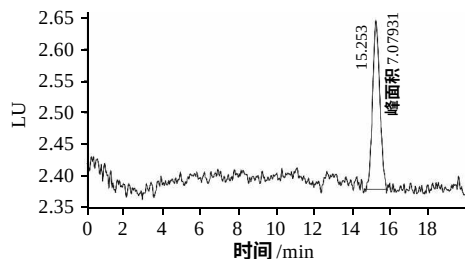


图2 植物油样品加标后的RP-HPLC色谱图

Fig.2 RP-HPLC chromatogram of vegetable oil sample spiked with benzo(a)pyrene

图2出现一个保留时间为15.253min洗脱峰,加入苯并(a)芘标准品后,与样品的RP-HPLC图谱(图1)比较,洗脱峰增大,未出现新的峰,从而确证植物油样品中存在研究对象苯并(a)芘。

2.3 精密度实验

采用无苯并(a)芘残留的植物油进行加标实验,对方法的精密度进行研究,采用低、中、高(即2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/L}$)3个质量浓度的苯并(a)芘标准溶液,样品前处理方法同1.2.3.2节,在上述最佳色谱条件下,每个质量浓度进行6次平行实验,结果见表1。

表1 精密度实验测定结果($n=6$)

Table 1 Precision determination of the method($n=6$)

项目	标样质量浓度/ $\mu\text{g/L}$		
	2.5	5.0	10.0
测定值/ $\mu\text{g/L}$	2.39	4.92	9.79
	2.53	5.06	9.68
	2.45	4.91	9.98
	2.51	4.97	10.02
	2.47	4.99	9.82
	2.38	4.95	9.81
测定平均值/ $\mu\text{g/L}$	2.46	4.97	9.85
测定值标准偏差/ $\mu\text{g/L}$	0.061	0.054	0.127
相对标准偏差/%	2.5	1.1	1.3

从表1可见,低、中、高3个质量浓度的苯并(a)芘相对标准偏差在1.1%~2.5%之间,证明该方法重现性与稳定性好,系统误差小,精密度高。

2.4 加标回收率实验

向1.0g左右的无苯并(a)芘残留的植物油样品中分别加入5.0、10.0、20ng的苯并(a)芘标准物质。按照1.2.3.2节的处理方法对样品进行前处理,在上述最佳色谱条件下,每个质量浓度进行6次平行实验,外标法计算平均回收率,结果见表2。

表2 回收率实验测定结果($n=6$)

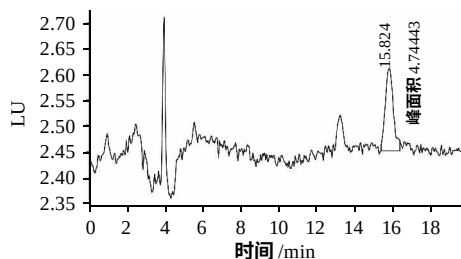
Table 2 Recovery determination of the method($n=6$)

项目	加入标准物质量/ng		
	5.0	10.0	20.0
测定值/ng	4.31	9.55	18.67
	4.62	8.99	19.02
	4.55	9.34	18.18
	4.51	9.46	17.86
	4.46	9.79	18.23
	4.03	9.52	18.07
回收率/%	88.3	94.4	91.7
测定平均值/ng	4.41	9.44	18.34
相对标准偏差/%	4.9	2.8	2.3

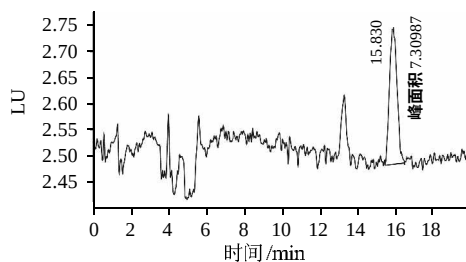
从表2可见,加标回收率在88.3%~94.4%之间,相对标准偏差在2.3%~4.9%之间,两者均小于5%,说明该方法具有较高的可靠性,符合实验要求。

2.5 实际样品的检测

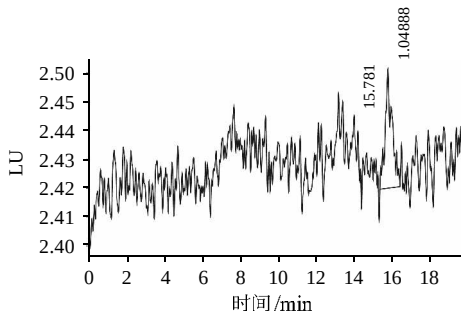
本方法用5种不同质量浓度的质控样品进行测试分析。精确称取0.8000g左右油样,按照上述最佳GPC净化浓缩条件对样品进行前处理,用最佳HPLC条件对样品进行分析,色谱图见图3,测定结果见表3。



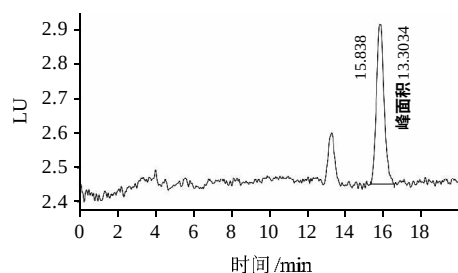
A.山茶油样品1



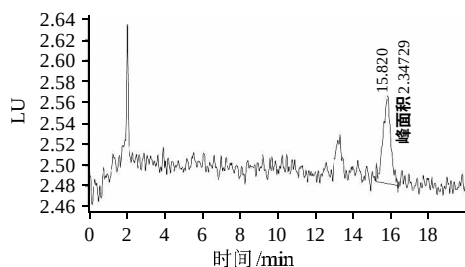
B.山茶油样品2



C.山茶油样品3



D.大豆油样品 1



E.大豆油样品 2

图 3 实际样品的 RP-HPLC 色谱图

Fig.3 RP-HPLC chromatogram of 5 different quality control samples

表 3 质控样品的苯并(a)芘测定值与结果

Table 3 Results of benzo(a)pyrene determination in 5 different quality control samples using the method

样品号	样品 质量 /g	峰 面积	计算值 / ($\mu\text{g/kg}$)	参考值 / ($\mu\text{g/kg}$)	相对 偏差 /%
山茶油样品 1	0.8429	4.74	10.33	10	3.3
山茶油样品 2	0.8735	7.31	15.43	15	2.9
山茶油样品 3	0.8124	1.04	2.27	2.5	9.2
大豆油样品 1	0.8466	13.30	29.05	30	3.2
大豆油样品 2	0.8137	2.35	5.25	5.0	5.0

从表 3 可见, 3 种不同质量浓度的质控样品的测定值与实际参考值进行比对, 相对偏差为 3.2%~9.2%, 表明分析结果准确、可靠, 具有广泛的应用价值。

3 结 论

3.1 植物油样品基质成分复杂, 大分子有机物种类繁多, 前处理不好直接影响检测结果的判定。与 GB/T 22509—2008 中的玻璃层析柱前处理方法相比, 本实验采用的全自动凝胶渗透色谱前处理方法可以大大提高工作效率, 提高分析的准确度和精密密度。

3.2 本研究采用凝胶渗透色谱和高效液相色谱联用技术

对植物油中苯并(a)芘残留量进行测定, 以保留时间定性、外标法定量。结果表明: 苯并(a)芘在 0~20 $\mu\text{g/L}$ 范围内的线性相关系数是 0.9998, 植物油样品的最低检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 加标回收率为 88.3%~94.4%, 相对标准偏差为 2.3%~4.9%。该方法是一种快速、灵敏、稳定可靠的测定食用植物油中苯并(a)芘残留量的方法, 对 5 种不同质量浓度质控样品进行测试分析, 均获得满意的结果, 符合食用食物油中苯并(a)芘残留量检测的技术要求。

参考文献:

- [1] 王丹. 食品安全隐患: 苯并(a)芘的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(1): 132-135.
- [2] 王珊, 和昕, 林玲. 可吸入尘中苯并(a)芘超声提取的高效液相色谱测定法[J]. 城市环境与城市生态, 1993(3): 37-40.
- [3] 黄靖芬, 李来好, 陈胜军, 等. 烟熏食品中苯并(a)芘的产生机理及防止方法[J]. 现代食品科技, 2007(7): 67-70.
- [4] 张清文, 贾建廷, 贾斌. 高效液相色谱法测定空气中苯并(a)芘的探讨[J]. 山西化工, 1998(3): 23-25.
- [5] 赵月兰. 化学致癌物质对动物性食品的污染及其危害[J]. 肉品卫生, 1996(10): 24-26.
- [6] 江燕. 烟熏肉制品中多环芳烃的 SPE-HPLC 检测方法研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008: 15-61.
- [7] 万红丽, 周光宏, 陈明, 等. 烧烤肉制品中 3,4-苯并(a)芘检测的前处理方法[J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(4): 140-143.
- [8] 马海花, 乔磊, 孙志武, 等. 样品快速前处理 HPLC 测环境中苯并(a)芘[J]. 平顶山师专学报, 2003(2): 75-76.
- [9] 黎远冬, 刘宗河, 涂文升, 等. 花生油中苯并(a)芘的高效液相色谱测定[J]. 广西预防医学, 1997(1): 29-31.
- [10] 熊宛英, 赵立蔚, 徐海栋, 等. 天津市环境空气中苯并(a)芘(Bap)的探讨[J]. 天津建设科技, 2001(2): 26-27.
- [11] 万红丽, 周光宏, 徐幸莲, 等. 肉制品中 3,4-苯并(a)芘的残留与检测[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 251-253.
- [12] 李伟红, 戴廷灿, 周瑶敏, 等. 高效液相色谱法测定熟肉制品中的苯并(a)芘[J]. 江西农业学报, 2008, 20(1): 86-88.
- [13] PURCARO G, MORET S, CONTE L S. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat[J]. Meat Science, 2009, 81(4): 275-280.
- [14] 蔡玉枝, 苏文周. 高效液相色谱法快速测定食用植物油中苯并(a)芘[J]. 分析科学学报, 2001, 17(2): 175.
- [15] 董广彬, 李鹏, 姜俊. 食用植物油中苯并(a)芘检测结果分析[J]. 粮油加工, 2009(7): 67-68.
- [16] 归建红. 室内香烟烟雾中强致癌物苯并(a)芘的测定[J]. 青海环境, 1999(4): 188-189.
- [17] 姚渭溪, 熊涛, 崔文, 等. 两波长定域同步荧光光谱法快速测定苯并(a)芘的研究[J]. 环境科学, 1992(2): 73-76.
- [18] 张书胜, 刘红霞, 刘朝晖, 等. 强致癌物苯并(a)芘的高效液相色谱荧光分析法研究及应用(II): 郑州地区饮用水中苯并(a)芘污染评价[J]. 应用基础与工程科学学报, 1996(1): 1-4.