

二甲亚砜提取—冷冻离心净化测定食品中苯并[a]芘及苯并[e]芘

邓丽娟^{1,2}, 洪霞^{1,2}, 钱滢文^{1,2}, 高志莹^{1,2},

何海宁^{1,2}, 刘琦^{1,2}, 周鑫魁^{1,2}

(1. 甘肃省商业科技研究所, 甘肃兰州 730010;

2. 甘肃中商食品质量检验检测有限公司, 甘肃兰州 730010)

摘要:建立以二甲亚砜作为提取溶剂, 冷冻离心提取净化食品中的苯并[a]芘和苯并[e]芘, 高效液相色谱—荧光法检测的方法。替代传统的固相萃取小柱净化方式, 能更快速、高效、准确检测食品中苯并[a]芘和苯并[e]芘的含量。2种目标物在0.5~1 000 ng/mL范围内呈现良好线性关系, 在1~100 ng/g添加量下, 回收率为89.0%~91.3%, 相对标准偏差为1.19%~1.29%; 仪器检出限为0.01 ng/mL, 植物油脂方法检出限为0.05 ng/g, 肉制品和动物油脂方法检出限为0.02 ng/g。该方法测定动植物油脂和肉制品中的苯并[a]芘和苯并[e]芘方便、快捷, 适用于批量化检测。

关键词:二甲亚砜; 苯并[a]芘和苯并[e]芘; 动植物油脂; 冷冻离心

中图分类号:TS 201.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)02-0069-05

Determination of benzo [a] pyrene and benzo [e] pyrene in food by extraction with dimethyl sulfoxide and purification with refrigerated centrifugation

DENG Li - juan^{1,2}, HONG Xia^{1,2}, QIAN Ying - wen^{1,2},

GAO Zhi - ying^{1,2}, HE Hai - ning^{1,2}, LIU Qi^{1,2}, ZHOU Xin - kui^{1,2}

(1. Gansu Business Science and Technology Institute, Lanzhou Gansu 730010;

2. Gansu Zhongshang Food Quality Test and Detection Co., Ltd., Lanzhou Gansu 730010)

Abstract: Benzo [a] pyrene and benzo [e] pyrene in food was extracted and purified by refrigerated centrifugation with dimethyl sulfoxide as solvent and analyzed by HPLC - fluorescence detection method. This method can replace the traditional solid - phase extraction column purification method, which is faster, more efficient and accurate in the detection of benzo [a] pyrene and benzo [e] pyrene content. Both target object showed a good linear relationship within range of 0.5 ~ 1 000 ng/mL, when addition was 1 ~ 100 ng/g, the recovery rate was 89.0% ~ 91.3%, and the relative standard deviation was 1.19% ~ 1.29%; the detection limit was 0.01 ng /mL, vegetable fat detection limit was 0.05 ng/g, meat and animal fat detection limit was 0.02 ng/g. This method is faster and more convenient in the detection of benzo [a] pyrene and benzo [e] pyrene in animal, vegetable fat and meat products, which is suitable for batch detection.

Key words: dimethyl sulfoxide; benzo [a] pyrene, benzo [e] pyrene; animal and vegetable oils and fats; refrigerated centrifugation

苯并[a]芘(BaP)结构为含有五个苯环的稠环

芳香烃^[1]。是一种高活性致癌剂, 是世界公认的三大强致癌物质(黄曲霉毒素、苯并[a]芘、亚硝胺)之一^[2-3]。小剂量苯并[a]芘就能引起局部组织癌变, 也可引起大鼠外周血淋巴细胞DNA、肺细胞以及肝细胞损伤^[4-6]。食品在加工过程中很容易产生苯并芘, 例如油料在晾晒过程中可能受到苯并芘污

收稿日期: 2016-08-24

基金项目: 中国-马来西亚科技交流合作项目(1604WKCA001); 甘肃-青海食品研究开发与检测联合实验室建设经费项目(1606RTSA337)

作者简介: 邓丽娟, 1988年出生, 女, 硕士, 工程师。

通讯作者: 周鑫魁, 1986年出生, 男, 硕士, 工程师。

染,在浸出阶段温度过高可能产生苯并芘,在油料焙烤时也可能产生苯并芘^[7]。目前由食品污染导致的疾病已成全世界最为广泛关注的食品安全问题,许多国家已将苯并[a]芘列为食品有害物质检测的重要内容之一,但是对苯并[e]芘的检测并没有相关国标方法支持。苯并[e]芘是苯并[a]芘的同分异构体,致癌性虽然没有苯并[a]芘强,但是仍然存在潜在的致癌可能性。经过对大量油脂及肉制样品的检测发现,所有样品中不仅有苯并[a]芘,还含有苯并[e]芘。所以对苯并[e]芘的检测工作也需要引起人们的关注。

食品中苯并[a]芘的检测方法主要有薄层层析法、荧光分光光度法、高效液相色谱法和气相色谱—质谱联用法。薄层层析法操作步骤繁琐,分析周期长,不适用大批样品的处理。其它三种方法在生产实践中应用较广泛。我国动植物油脂中苯并[a]芘的检测标准主要是 GB/T 22509—2008,该方法采用反相液相色谱法,植物油脂类样品通过石油醚稀释,经氧化铝固相萃取小柱净化^[9-14],荧光检测器检测。液相色谱方法具有自动化程度高,荧光检测器也具有高灵敏度,但固相萃取小柱由于容量固定,对苯并[a]芘含量较高的样品检测回收率低,重复性不好^[15-19]。本实验提出的采用二甲亚砜快速液—液萃取、冷冻离心净化的方法,其萃取富集率高,结果稳定性好。能有效地净化样品,缩短了处理周期,达到快速又准确的目的。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

二甲基亚砜(分析纯):sigma 公司;苯并[a]芘(≥99.9%)和苯并[e]芘(≥99.9%):Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;乙腈(色谱纯):北京百灵威科技有限公司。

RX-II 离心机:中国天美公司;岛津 LC-20A 高效液相色谱仪:日本岛津公司;DHG-9073BS-II 电热恒温干燥箱:上海新苗医疗器械制造有限公司;IKA 圆周振荡器:德国 IKA 公司;XB220 电子天平:普利赛斯国际贸易(上海)有限公司;DS-1 电动组织捣碎机:上海精科实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理

粮食、肉制品和动物油样品置于组织捣碎机中捣碎均匀,称取样品 2.500 g,置于烘箱 105 °C 将水

分烘干,约 2~3 h,趁热加入 5.00 mL 二甲基亚砜,涡旋提取 2 min。放入冷冻离心机中,在 20 °C、5 000 r/min 下冷冻离心 10 min,下层液体即为待测液,0.22 μm 尼龙滤膜过滤后上机进样。

称取植物油脂 1.00 g 于离心管中,加入 5.00 mL 二甲基亚砜,涡旋提取 2 min 后,放入冷冻离心机中,在 -4 °C 的温度下、5 000 r/min 下离心 10 min,放入温度为 -4 °C 冰盐浴中,弃去上层的植物油脂,在室温下融化凝固的二甲基亚砜,过 0.22 μm 尼龙滤膜后上机进样。

1.2.2 标准溶液配制

准确称取苯并[a]芘和苯并[e]芘标准品各 10.0 mg,于 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,得到苯并[a]芘和苯并[e]芘浓度均为 1 mg/mL 的混合标准储备液。量取 1 mg/mL 的混合标准储备液 0.10 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度,得到 1.00 μg/mL 的混合标准中间液。分别取该混合标准中间液 0.05、0.10、1.00、5.00、7.50、10.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容刻度,得到浓度分别为 0.50、1.00、10.00、50.00、75.00、100.00 ng/mL 的 6 个混合标准溶液,在高效液相色谱仪中进行测定,检测器为带荧光检测器,得到苯并[a]芘和苯并[e]芘的标准曲线。

1.2.3 色谱条件

色谱柱:岛津 ODS-SP 柱,5 μm,4.6 × 250 mm;流动相:超纯水 + 乙腈(超纯水和乙腈的体积比为 15:85;流速:1.0 mL/min;柱温:30.0 °C;荧光激发波长:384 nm;荧光发射波长:406 nm;进样量:20 μL。

2 结果与分析

2.1 分离效果

图 1 为苯并[e]芘和苯并[a]芘标准色谱图,苯并[e]芘出峰时间为 10.05 min,苯并[a]芘出峰时间为 10.66 min,苯并[e]芘和苯并[a]芘峰型对称,

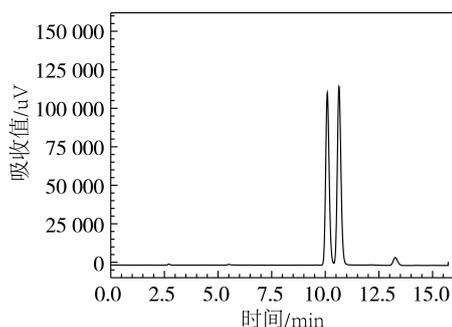


图 1 苯并[e]芘和苯并[a]芘色谱图

分离度好,说明该色谱条件能满足苯并[e]芘和苯并[a]的同时检测。

二甲基亚砜是一种非质子极性溶剂,有很强的萃取能力,可以作为芳香烃类抽提溶剂,两种苯并芘都是典型的芳香烃类化合物,二甲基亚砜可与苯并芘无限混溶,又具有与油脂不溶的特点,因此可以高效从油脂中萃取苯并芘。再利用二甲基亚砜熔点为 18.5 °C,可以和植物油脂在 -4 °C 下冷冻离心,形成二甲基亚砜固体下层和植物油脂液体上层,达到净化的目的;可以和动物油脂在 20

°C 下离心,形成二甲基亚砜液体下层和动物油脂固体上层,到达净化目的。最后利用苯并芘的荧光特性,经过高效液相色谱仪,检测并计算出样品中苯并芘的含量。

2.2 回收率及精密度

通过不同加标量下的回收率来比较两种方法的精密度,在 6 份同一种阳性菜籽油样品中加入苯并[a]芘和苯并[e]芘,制备不同质量体积浓度的 6 份加标样品。分别按 GB/T 22509—2008 和本方法进行实验,结果如表 1 所示。

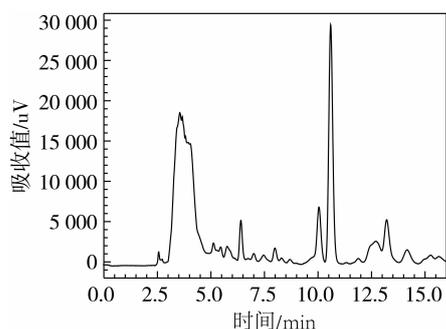
表 1 加标回收率和精密度测定结果(n=6)

添加浓度/(ng/g)	GB/T22509—2008				本方法				
	本底浓度/(ng/g)	实测浓度/(ng/g)	回收率/%	RSD/%	本底浓度/(ng/g)	实测浓度/(ng/g)	回收率/%	RSD/%	
1	6.3	7.19	89		6.3	7.21	91		
苯并[a]芘	10	6.3	15.07	87.7	4.86	6.3	15.23	89.3	1.19
100	6.3	87.52	81.2		6.3	97.62	91.3		
1	0.75	1.65	90		0.75	1.64	89		
苯并[e]芘	10	0.75	9.27	85.2	4.37	0.75	9.88	91.3	1.29
100	0.75	83.34	82.6		0.75	91.13	90.4		

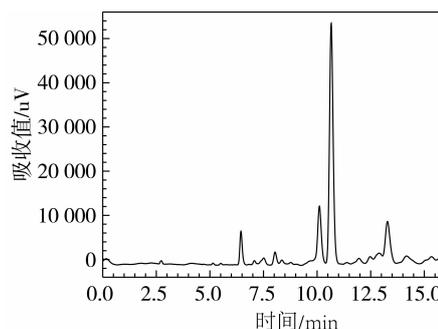
由表 1 可以看出国标方法回收率随样品中苯并芘添加量的增加而降低。而本方法回收率随样品中苯并芘含量的增加表现稳定,均保持在 89.0% ~ 91.3% 之间,检测浓度范围可以达到 1.00 ~ 100.00 ng/g,比国标 GB/T 22509—2008 适用检测范围更广。相对标准偏差在 1.19% ~ 1.29% 之间,表明该方法准确度和精密度较好,能够满足苯并芘含量的检测要求。

2.3 净化效果比较

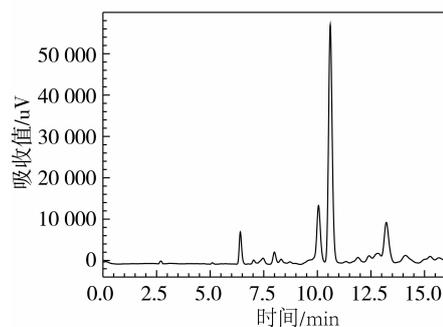
图 2 中色谱图 a 为不经过固相萃取柱净化的样品,色谱图 b 按国标 GB/T 22509—2008 的方法处理,色谱图 c 按本方法处理的油脂样品液相色谱图。



a 国标法未经固相萃取柱净化



b 国标法



c 本方法

图 2 净化效果图

从图 2 可以看出未净化油脂样品的色谱图中,杂质峰很多。按国标方法对油脂样品进行,固相萃取小柱净化后,能有效除去杂质峰。而本发明

方法也能有效除去样品中的杂质,杂质峰明显减少,且能达到检测要求,其与国标中氧化铝固相萃取小柱净化效果相当。但比起国标固相萃取法又方便、快捷,且回收率稳定,适用于大批量样品的检测。

王浩等用溶剂直接稀释植物油样品上机进行分析,操作非常简单快速,且重现性好。但因油样未经净化处理,会污染色谱柱降低柱效,缩短使用寿命,也可能因杂质的存在干扰检测结果的准确性^[17]。本方法既结合了液液萃取法简便快捷的特点又达到了国标固相萃取的净化效果,有效地降低杂峰的干扰。

2.4 标准工作曲线的线性回归方程、相关性系数、线性范围、最低检出限

以线性范围评价该方法的检测浓度范围,以最低检出限评价该方法灵敏度,结果见表2。由表2可知,当3倍信噪比对应的浓度为仪器检出限,由于苯并[a]芘和苯并[e]芘互为同分异构体,光谱行为相似,荧光强度相似,所以苯并[a]芘和苯并[e]芘最低响应浓度均为0.01 ng/mL,植物油脂样品采用稀释5倍的形式进行前处理,两种苯并芘方法检出限均为0.05 ng/g;肉制品和动物油脂样品采用稀释2倍的形式进行前处理,两种苯并芘方法检出限均为0.02 ng/g。

表2 线性回归方程、相关性系数、线性范围、检出限及精密度

组分名称	线性范围/(ng/mL)	回归方程	相关系数(R ²)	3倍信噪比/(ng/mL)	植物油脂中检出限/(ng/g)	肉制品中检出限/(ng/g)
苯并[a]芘	0.5~1 000	y=145.79x+15.969	0.999 6	0.01	0.05	0.02
苯并[e]芘	0.5~1 000	y=127.41x-2.937	0.999 9	0.01	0.05	0.02

2.5 适用性实验

在市场随机抽取食用油样品20份,大米样品20份,烤肉样品20份,按照本实验方法检测上述样品中2种苯并芘的含量。20份食用油中均含有两种苯并芘,苯并[a]芘含量为0.6~27.4 ng/g,苯并[e]芘含量为0.1~6.3 ng/g,其中有3份食用油样品中苯并[a]芘的含量超过国家标准限量10.0 ng/g,菜子油和胡麻油中苯并芘含量较多,橄榄油、花生油中含量较少,这与压榨工艺有很大关系。20份大米样品中2种苯并芘含量均小于1.0 ng/g。20份烤肉样品中以烤制的样品不同,苯并芘含量也有很

大区别。如在烤鱼、烤猪蹄、烤香肠等样品中2种苯并芘含量均小于1.0 ng/g,这是因为样品中脂肪少,多为蛋白和淀粉类物质不易产生苯并芘。但在烤肉中苯并[e]芘含量为1.8~11.4 ng/g,苯并[a]芘含量为3.3~27.5 ng/g,而且有10份烤肉样品中苯并[a]芘含量超过国家标准限量5.0 ng/g,所采集烤肉样品中大部分以大块肥肉为材料,经过长时间高温烤制或油炸,很容易产生苯并芘,仅有1份炭火烤肉样品为3块瘦肉加1块肥肉为材料,其苯并芘含量为4.57 ng/g。食用油脂及烤肉类样品检测数据如表3所示。

表3 样品检测结果

样品	苯并[e]芘/(ng/g)	苯并[a]芘/(ng/g)	样品	苯并[e]芘/(ng/g)	苯并[a]芘/(ng/g)	样品	苯并[e]芘/(ng/g)	苯并[a]芘/(ng/g)
花生油-1	0.33	2.43	菜籽油-1	2.52	9.13	炭火烤肉-2	2.68	18.47
花生油-2	0.49	5.63	菜籽油-2	6.27	27.38	炭火烤肉-3	0.64	4.57
花生油-3	0.16	1.55	菜籽油-3	1.92	6.39	电烤肉-1	3.84	20.42
大豆油-1	1.53	9.26	香油-1	0.97	6.75	电烤肉-2	2.16	17.38
大豆油-2	0.48	3.07	香油-2	1.04	7.72	电烤肉-3	2.67	21.53
大豆油-3	2.75	14.39	香油-3	0.66	5.28	大串烤肉-1	5.62	26.80
橄榄油-1	0.21	2.04	烤鱼-1	0.12	0.85	大串烤肉-2	11.35	27.51
橄榄油-2	0.28	2.31	烤鱼-2	0.09	0.92	大串烤肉-3	7.34	25.94
橄榄油-3	0.13	0.68	烤鱼-3	0.07	0.78	烤香肠-1	0.68	4.15
胡麻油-1	3.82	19.43	烤猪蹄-1	0.08	0.76	烤香肠-2	0.59	4.67
胡麻油-2	1.83	8.94	烤猪蹄-2	0.11	0.98	烤香肠-3	0.54	2.74
胡麻油-3	1.06	7.48	烤猪蹄-3	0.09	0.90	油炸肉串-1	3.25	17.94
玫瑰籽油-1	1.11	8.86	炭火烤肉-1	1.85	14.87	油炸肉串-2	2.84	19.48
玫瑰籽油-2	0.89	7.69						

3 结论

本方法以二甲基亚砜作为提取溶剂,二甲基亚砜可与苯并芘无限混溶,又具有与油脂不溶的特点,因此可以高效的从油脂中萃取苯并芘。再利用二甲基亚砜熔点为 18.5 °C,可以和植物油脂在 -4 °C 下冷冻离心,形成二甲基亚砜固体下层和植物油脂液体上层,达到净化的目的;可以和动物油脂在 20 °C 下离心,形成二甲基亚砜液体下层和动物油脂固体上层,到达净化目的。最后利用苯并芘的荧光特性,经过高效液相色谱仪,检测并计算出样品中苯并芘的含量。

本方法建立的高效液相色谱—荧光法检测动植物油脂和肉制品中的苯并芘,具有回收率高,稳定性强,检测范围广,操作简便易行,省时等特点,适用于批量检测动植物油脂和肉制品中苯并芘的前处理,有效地解决了国标方法的缺点。

参考文献:

- [1]李念念,周光宏,徐幸莲,等. 高效液相色谱荧光法测定腊肉中的苯并芘残留[J]. 食品工业科技, 2013, 34(1): 319-321.
- [2]张晓燕,黄力,倪小英,等. 高效液相色谱法测定抽油烟机中油的苯并芘含量[J]. 粮食科技与经济, 2011, 36(6): 50-51.
- [3]Escarrone A L V, Caldas S S, Furlonga E B, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method[J]. Food Chemistry, 2014, 146(3): 597-602.
- [4]Yan Zhanga, Hong-Yan Zoub, Pei Shia, et al. Determination of benzo[a]pyrene in cigarette mainstream smoke by using mid-infrared spectroscopy associated with a novel chemometric algorithm[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 902(1):43-49.
- [5]Simko P. Changes of benzo(a)pyrene contents in smoked fish during storage[J]. Food Chemistry, 1991, 40(3): 293-300.
- [6]张晓燕,吴朋,黄力,等. 固相萃取柱-HPLC测定植物油脂中苯并芘含量[J]. 粮食科技与经济, 2013, 38(4): 34-36.
- [7]曾习文,李宏,夏立新,等. 肉制品中3,4-苯并(a)芘检测方法的改进[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 82-84.
- [8]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.
- [9]吴海智,周丛,袁列江,等. 高效液相色谱法快速测定植物油中苯并芘的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 6075-6076.
- [10]GB/T 5009.27-2003, 食品中苯并(a)芘的测定[S].
- [11]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[S].
- [12]Guadalupe María Guatemala - Morales, Elisa Alejandra Beltrán - Medina, Mario Alfonso Murillo - Tovar, et al. Validation of analytical conditions for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by gas chromatography - mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2016, 197(15): 747-753.
- [10]Chunyan Du, Yaqi Hu, Yunchao Li, et al. Electrochemical detection of benzo(a)pyrene in acetonitrile - water binary medium[J]. Talanta, 2015, 138(1): 46-51.
- [13]宋长虹,唐生,佟馨,等. 食用油脂中苯并(a)芘检测方法比较与优化[J]. 食品研究与开发, 2014, 35(23): 83-86.
- [14]吴腾,崔向云,扎木则仁,等. 液相色谱法测定奶油中苯并(a)芘的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 06(8): 3287-3290.
- [15]刘小文,全沁果,敖艳,等. 食用油中苯并(a)芘检测技术研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(12): 125-128.
- [16]王珍. 食用油中苯并(a)芘检测的前处理及其 GC/MS 分析[D]. 南宁:广西大学, 2013: 2-4.
- [17]Guo-fang Lin, Stefan Weigel, Billy Tang, et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in Peking duck: Relevance to food safety assessment [J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 524-527.
- [18]Beata Janoszk. HPLC - fluorescence analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pork meat and its gravy fried without additives and in the presence of onion and garlic[J]. Food Chemistry, 2011, 126(3): 1344-1353.
- [19]王浩,刘艳琴,杨红梅,等. 高效液相色谱法测定化妆品中苯并芘残留[J]. 分析实验室, 2010, 28(10): 221-222. 