

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.06.019

柳永英, 蒋文佳, 胡蓉, 等. 高效液相色谱法检测植物油中双酚 A 含量方法研究[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(6): 153-158.

LIU Y Y, JIANG W J, HU R, et al. Study of the method for the determination of bisphenol a in vegetable oil by high performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(6): 153-158.

高效液相色谱法检测植物油中双酚 A 含量方法研究

柳永英, 蒋文佳, 胡蓉, 伍先绍

(广西壮族自治区粮油质量检验中心, 广西南宁 530034)

摘要: 通过对高效液相色谱法检测植物油中双酚 A 含量测定的研究, 建立了植物油中双酚 A 含量的测定方法。采用乙腈提取, 提取液经氨基固相萃取柱净化和洗脱、浓缩、复溶、过滤后, 经高效液相色谱分离、荧光检测器检测、外标法定量。方法学性能考察表明, 线性范围为 0.003 333~0.666 7 $\mu\text{g/mL}$, 标准曲线的相关系数 (r) 大于 0.999; 方法检出限为 0.007 mg/kg, 定量限为 0.013 mg/kg; 方法的回收率范围为 90.8%~103.2%, 7 次重复测定的变异系数为 2.8%。经验证确定该方法线性良好, 灵敏度高, 重复性好, 结果准确可靠, 符合 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》的要求, 可为科学评价植物油中双酚 A 含量提供技术依据。

关键词: 双酚 A; 植物油; 高效液相色谱法; 含量测定; 方法确认

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2022)06-0153-06

网络首发时间: 2022-09-01 10:28:57

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20220831.1838.016.html>

Study of the Method for the Determination of Bisphenol A in Vegetable Oil by High Performance Liquid Chromatography

LIU Yong-ying, JIANG Wen-jia, HU Rong, WU Xian-shao

(Grain and Oil Quality Inspection Center of Guangxi, Nanning, Guangxi 530031, China)

Abstract: Through the research on the determination of bisphenol A in vegetable oil by high-performance liquid chromatography, this article established the method for determining bisphenol A in vegetable oil. Bisphenol A was extracted with acetonitrile. The extract was purified and eluted by the amino solid-phase extraction column and then concentrated and reconstituted. After filtration, the extract was separated by high-performance liquid chromatography, detected by the fluorescence detector, and quantified by the standard external method. The methodological performance analysis showed that the linear range was 0.003 333~0.666 7 $\mu\text{g/mL}$, the correlation coefficient (r) of the standard curve is greater than 0.999, the detection limit of the method is 0.007 mg/kg, see the quantification limit was 0.013 mg/kg, the recoveries

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 全国粮标委油料及油脂分技术委员会委托粮油标准制定计划项目(2018)

Supported by: Grain and Oil Standard of Formulation Planning Project, Commissioned by the Oil Sub-technical Committee of the National Grain Standard Commission

作者简介: 柳永英, 女, 1963 年出生, 本科, 高级工程师, 研究方向为粮油质量标准及检验。E-mail: 2820465811@qq.com.

ranged from 90.8% to 103.2%, and the coefficient of variation of seven replicate assays was 2.8%. It was verified that the method had good linearity, high sensitivity, good repeatability, accurate and reliable results, and could meet the requirements of GB/T 27417—2017<Conformity assessment-Guidance on validation and verification of chemical analytical methods>, providing a technical basis for the scientific evaluation of the content of bisphenol A in vegetable oil.

Key words: Bisphenol A; vegetable oil; high performance liquid chromatography; content determination; method validation

双酚 A (bisphenol A, BPA), 学名为 2,2-二对羟基苯基丙烷, 可用于制造环氧树脂、聚碳酸酯、聚酚氧等多种高分子材料, 被大量应用于食品塑料包装制品中, 如饮用水瓶、植物油瓶、婴儿奶瓶等^[1]。双酚 A 是脂溶性物质, 在用于储存食品过程中, 容易迁移到食品中, 其毒性受到各国普遍关注。经科学家多年的毒理研究, 发现其进入人体后, 能影响内分泌、生殖和神经系统以及产生促癌等不良作用, 特别是婴幼儿, 可能导致婴儿荷尔蒙分泌异常和胸部发育障碍^[1-2], 对消费者, 特别是婴幼儿人群, 存在着潜在的危害。因此, 各国对于双酚 A 在食品包装材料中的使用进行了规范。2018 年, 欧盟发布法规 (EU) 2018/213 规定食品接触材料中的双酚 A 的迁移限量为 0.05 mg/kg^[3], 其中婴幼儿食品、特殊医疗用途食品、婴儿配方奶粉等专门针对婴幼儿的产品的接触清漆或涂层材料和塑料物品不得含有双酚 A。欧盟认为含有双酚 A 的奶瓶会诱发性早熟, 从 2011 年 3 月 2 日起, 禁止生产含有双酚 A 的婴儿奶瓶。含有双酚 A 的热敏纸在部分发达国家已经禁止使用。双酚 A 也已被列入欧洲化学品管理局高度关注物质候选清单。此外, 2018 版 OEKO-TEX® Standard100 (世界上最权威的纺织品生态标签) 也将双酚 A 列入受限物质。2021 年 5 月 30 日, 我国卫生部等六部门下达禁令, 禁止双酚 A 用于婴幼儿奶瓶中。为此我国出台《食品安全国家标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准》(GB 9685—2016), 明确规定双酚 A 用于食品接触塑料、涂料、粘合剂时, 其特定迁移量应不超过 0.6 mg/kg^[4]。

目前, 我国食用植物油产品包装容器主要为塑料容器, 为了有效监测塑料容器可能对食用植

物油储存带来的风险, 我国将植物油中双酚 A 的风险评估监测列入国家计划, 经监测, 发现植物油中双酚 A 也有被检出的情况。但是, 目前我国没有制定检测食用植物油中双酚 A 含量的国家标准或行业标准, 影响植物油中双酚 A 风险评估的科学评价。现有相关双酚 A 检测国家标准有《食品安全国家标准 水产品中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 烯雌乙炔雌二醇、17 雌二雌二醇、雌三醇残留量的测定 气相色谱-质谱法》(GB 31660.2—2019), 《化妆品中污染物双酚 A 的测定 高效液相色谱-串联质谱法》(GB/T 30939—2014), 《食品安全国家标准 食品接触材料及制品 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷(双酚 A)迁移量的测定》(GB 31604.10—2016), 《食品接触材料 高分子材料 食品模拟物中 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷(双酚 A)的测定 高效液相色谱法》(GB/T 23296.16—2009), 《化妆品中污染物双酚 A 的测定 高效液相色谱-串联质谱法》(GB/T 30939—2014)《出口化妆品中双酚 A 的测定 液相色谱荧光检测法》(SN/T 3822—2014), 这些标准方法均不适用植物油中双酚 A 的检测。

针对上述问题, 本研究根据双酚 A 的特性, 经查寻比对相关文献资料, 提出采用高效液相色谱法检测植物油中双酚 A 含量方法, 通过试验研究确定最优的检测条件, 同时依据《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017), 对植物油中双酚 A 含量的测定方法进行确认试验^[5-6]。

1 材料和方法

1.1 设备和材料

Agilent 1260 系列高效液相色谱仪(配有荧光

检测器): 安捷伦科技(中国)有限公司; 高速冷冻离心机: 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 多管涡旋振荡器: 莱普特科学仪器有限公司; 水浴氮吹仪: 上海旦鼎贸易有限公司; 氨基固相萃取柱(500 mg, 3 mL): 天津博纳艾杰尔科技有限公司。

双酚 A 标准物质, 纯度为 99.8%: 中国计量科学研究院; 乙腈(色谱级)、二氯甲烷(色谱级)、甲酸(色谱级)、甲醇(色谱级): 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 实验用水为一级水。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂配制

0.1%甲酸水溶液: 吸取 1 mL 甲酸于 1 000 mL 容量瓶, 加水定容, 混匀后超声备用。

乙腈-0.1%甲酸水溶液(43+57, 体积比): 取 430 mL 乙腈和 570 mL 0.1%甲酸水溶液, 混匀。

1.2.2 标准溶液配制

双酚 A 标准储备溶液: 准确称取 0.016 7 g 的双酚 A 标准品于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容。折算双酚 A 固体标准物质的纯度 99.8%, 实际配制标准储备溶液浓度为 666.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存, 有效期为 6 个月。

双酚 A 标准中间储备溶液: 准确移取 666.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的双酚 A 标准储备溶液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解, 再定容至刻度, 配制成 6.667 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 双酚 A 标准工作溶液。在 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存, 有效期为 2 周。

1.2.3 仪器分析条件和前处理方法

1.2.3.1 仪器色分析条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C18 柱, 长 250 mm, 内径 4.6 mm, 粒径 5 μm ; 流动相 B 相: 乙腈, A 相: 0.1%甲酸溶液, 梯度洗脱, 使用前过滤并脱气; 梯度洗脱条件: 43% B (0~10 min), 43%~100% B (10~12 min), 100%~43% B (12~15 min), 43% B (15~23 min); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 荧光检测器: 激发波长 230 nm; 发射波长: 313 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 50 μL 。

1.2.3.2 前处理方法 称取 1 g (精确至 0.000 1 g) 试样于 15 mL 具塞玻璃离心管中, 加入 5 mL

乙腈, 涡旋振荡 5 min, 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 3 min (转速 4 000 r/min), 立即吸取上清液, 收集于 50 mL 浓缩瓶中, 试样中再加 2 次 5 mL 乙腈, 分别重复上述涡旋提取步骤, 合并 3 次上清液, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干, 准确加入 10 mL 二氯甲烷溶解残渣, 待净化。分两次准确移取试样提取液, 每次 2.5 mL, 过氨基固相萃取柱, 待样品溶液流完后, 用二氯甲烷 5 mL 分两次淋洗固相萃取柱, 弃去所有流出液, 最后用乙腈 7 mL 分两次洗脱, 用 10 mL 玻璃比色管收集洗脱液, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹浓缩至近干, 用 1 mL 乙腈-0.1%甲酸水溶液溶解残留物, 过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 收集滤液于进样瓶中, 供高效液相色谱检测。

1.3 数据分析

通过色谱条件的优化、提取次数、洗脱体积优化, 找出最佳色谱条件和样品前处理方法, 在依据 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》进行方法确认, 所有数据结果均按该标准附录 A 中要求进行评价分析。本实验中均应用 Microsoft Excel 进行数据处理和图表绘制, 色谱图和标准曲线图均为 Agilent 1260 高效液相色谱仪操作软件导出图。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

取植物油空白样品, 通过加标回收试验的方式, 对比空白样品和加标样品的色谱图, 调节流动相比比例, 要求双酚 A 出峰处无干扰峰, 且双酚 A 与其他峰的分离度达到 1.5, 再确定最佳的流动相比比例。经多种条件试验, 确定流动相为乙腈/0.1%甲酸水溶液梯度洗脱为最优的流动相条件, 其中乙腈梯度为: 43% (0~10 min), 43%~100% (10~12 min), 100%~43% (12~15 min), 43% (15~23 min), 色谱图见图 1, 出峰时间合适, 目标物无干扰峰, 分离度好。

2.2 提取次数的优化

参考国家标准 GB 9685—2016 中食品材料双酚 A 的迁移限量为 0.6 mg/kg 的规定, 选择 0.667 mg/kg 加标浓度, 考察不同提取次数时双酚

A 的回收率结果，以回收率的大小来确定最优提取次数，测定结果见表 1，经比较检测结果，确定最优提取次数为 3 次。

2.3 洗脱体积的选择

选择 0.667 mg/kg 加标浓度，考察 5、7、10 mL 不同体积乙腈洗脱氨基固相萃取柱时，双酚 A 的回收率情况，以回收率的大小来确定最佳洗脱液体积，测定结果见图 2，经比较检测结果，确定最优洗脱液体积为 7 mL。

表 1 不同提取次数的回收率测定结果
Table 1 Determination results of recovery rates of different extraction times %

提取次数/次	6 次测定结果的回收率						回收率平均值	变异系数
	1	2	3	4	5	6		
1	91.0	89.9	91.4	89.7	89.8	91.7	90.6	1.0
2	92.5	94.0	97.0	91.5	91.3	96.2	93.8	2.6
3	96.2	94.1	97.2	94.9	100.9	96.2	96.6	2.5

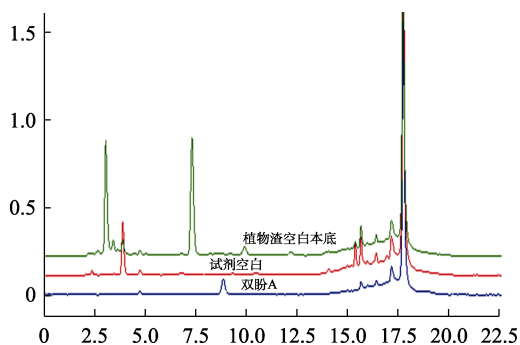


图 1 流动相梯度洗脱的色谱图

Fig.1 Chromatogram of gradient elution of mobile phase

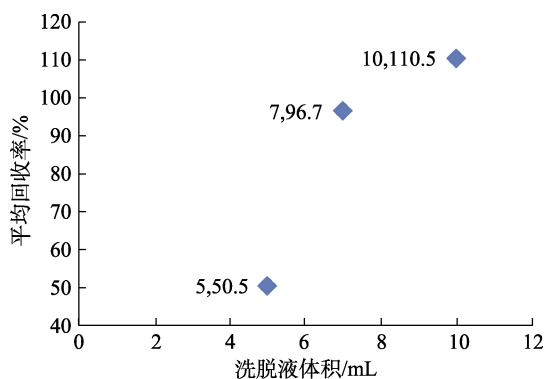


图 2 不同洗脱液体积的回收率测定结果

Fig.2 Determination results of recovery rates of different eluent volume

2.4 方法学性能考察

2.4.1 线性范围和相关系数

采用外标法配制标准曲线进行定量分析。配

制 8 个标准曲线点，绘制的标准曲线见图 3，浓度分别为 0.003 33、0.006 67、0.013 33、0.033 33、0.066 67、0.133 30、0.333 30、0.666 70 $\mu\text{g/mL}$ ，线性范围为 0.003 33~0.666 70 $\mu\text{g/mL}$ ，相关系数为 1，线性相关性良好。

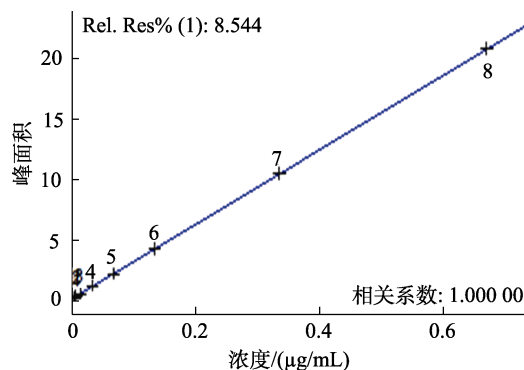


图 3 双酚 A 标准曲线

Fig.3 Bisphenol A of the standard curve

2.4.2 方法检出限

将双酚 A 标准溶液进行逐级稀释，测定其响应值，选择信噪比值在 2~3 的范围的浓度点进行方法检出限确认，确定浓度点为 0.006 67 $\mu\text{g/mL}$ ，再通过空白样品加标方式进行确证。将其与空白样品的测量信号进行比较，确定达到或接近 2 倍信噪比响应值的可靠含量，再将该含量减小一倍进行加标试验，能达到 2 倍信噪比的概率应小于 50%，该可靠含量即确证为方法检出限，测定结果见表 2，确证方法检出限为 0.007 mg/kg。

表 2 方法检出限测定结果

Table 2 Determination results of the detection limit

编号	测定值/(mg/kg)	信噪比	定性结果
1	0.003 03	1.1	阴性
2	0.003 30	0.95	阴性
3	0.003 08	1.1	阴性
4	0.003 77	1.1	阴性
5	0.003 37	2.1	阳性
6	0.003 23	1.7	阴性
1	0.006 86	2.3	阳性
2	0.007 17	2.1	阳性
3	0.006 04	2.1	阳性
4	0.007 16	2.9	阳性
5	0.006 69	3.3	阳性
6	0.006 87	2.1	阳性

2.4.3 方法定量限

在空白样品中按 2 倍方法检出限 (即 0.013 3 mg/kg) 的添加量进行加标实验, 确证方法定量限, 平行测定 6 次, 计算 6 次测定结果的回收率和变异系数, 根据 GB/T 27417—2017 中附录 A 和附录 B 的要求, 加标量小于 0.1 mg/kg 的范围, 回收率要求范围为 60%~120%, 精密度要求小于 15%, 6 次测定回收率范围为 92.6%~100.2%, 详见表 3。

表 3 方法定量限测定结果

Table 3 Determination results of the quantification limit

编号	测定值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	变异系数/%
1	0.013 1	98.8		
2	0.012 7	95.7		
3	0.012 3	92.6	97.0	2.8
4	0.013 0	97.8		
5	0.013 3	100.2		
6	0.012 9	97.3		

2.4.4 方法正确度

在空白样品中加入适量双酚 A 标准溶液进行加标回收实验, 添加浓度水平分别为 0.033 3、0.333 3、0.667 0 mg/kg, 每个点测定 3 次, 计算回收率和变异系数, 测定结果见表 4。根据 GB/T 27417—2017 中附录 A 和附录 B 的要求, 0.033 3、0.333 3、0.667 0 mg/kg 回收率范围要求分别为 60%~120%、80%~110%、80%~110%, 精密度要求范围分别为小于 15%、小于 11%、小于 11%, 确定三个浓度水平的方法正确度均满足要求。

表 4 方法正确度测定结果

Table 4 Determination results of the accuracy

理论值/(mg/kg)	测定值/(mg/kg)	回收率/%	平均值/(mg/kg)	变异系数/%
0.033 3	0.032 0	96.2	0.033	2.5
	0.033 6	101.0		
	0.033 2	99.8		
0.333 0	0.327 0	98.3	0.320	2.3
	0.313 0	94.0		
	0.318 0	95.5		
0.667 0	0.642 0	96.2	0.639	1.6
	0.628 0	94.1		
	0.648 0	97.2		

2.4.5 方法精密度

选择 0.033 3 mg/kg 进行方法精密度验证, 重

复测定 7 次, 计算其平均值和变异系数, 测定结果见表 5。结果表明, 重复 7 次回收率结果满足 GB/T 27417—2017 中附录 B 中要求, 回收率要求范围为 60%~120%, 精密度要求小于 15%。经验证, 7 次测定回收率范围为 92.6%~103.2%, 平均回收率为 99.1%, 变异系数为 2.8%, 确定方法精密度满足要求。

表 5 方法精密度测定结果

Table 5 Determination results of the precision

编号	测定值/(mg/kg)	回收率/%	理论加标值/(mg/kg)	平均值/(mg/kg)	变异系数/%
1	0.032 0	96.2			
2	0.033 6	101.0			
3	0.033 2	99.8			
4	0.032 0	96.2	0.033 3	0.033 0	2.8
5	0.032 8	98.6			
6	0.034 4	103.2			
7	0.032 9	98.8			

2.4.6 不同种类植物油的正确度确认

不同种类植物油空白样品的加标含量水平均为 0.333 mg/kg, 通过回收率结果进行评价, 要求回收率范围在 80%~110%, 且平行试验的相对相差均小于 11%, 测定结果见表 6。结果表明, 在 0.333 mg/kg 含量水平, 对于不同种类植物油的回收率和相对相差结果均符合要求, 本方法正确度均能满足要求。

表 6 不同种类植物油正确度测定结果

Table 6 Results of accuracy determination of different vegetable oils

植物油	测定值/(mg/kg)	回收率/%	平均回收率/%	相对相差/%
大豆油	0.326	97.8	97.9	0.4
	0.327	98.1		
花生油	0.338	101.6	101.2	0.8
	0.336	100.8		
菜籽油	0.335	100.7	100.3	0.8
	0.333	99.9		
葵花籽油	0.318	95.4	95.9	1.0
	0.321	96.4		
调和油	0.331	99.3	96.9	5.1
	0.314	94.4		
玉米油	0.303	91.1	91.0	0.2
	0.303	90.8		
山茶油	0.320	96.1	95.2	1.9
	0.314	94.2		

3 结论

本研究在优化检测条件的基础上,建立了高效液相色谱法检测植物油中双酚 A 含量的方法。经方法性能学考察,方法检出限为 0.007 mg/kg,定量限为 0.013 mg/kg,7 次重复测定结果的变异系数为 2.8%,方法的回收率范围为 90.8%~103.2%。结果表明,该方法满足植物油中双酚 A 含量测定需要,检测成本低,适应范围广,前处理设备简单且易操作,可为检测植物油中双酚 A 含量方法的建立以及监管实施和评价提供技术参考。

参考文献:

[1] 王艳婷,于学燕,姚蓉,等. 食品接触材料中双酚 A 迁移与检测的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(22): 219-224.
WANG Y T, YU X Y, YAO R, et al. The reaseach development of migration and detection of Bisphenol A in food contact materials[J]. Food Research And Development, 2017, 38(22): 219-224.

[2] 刘忠瑞,孙立文,李洋洋,等. 塑料食品包装材料中双酚 A 的迁移量检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 2350-2355.
LIU Z R, SUN L W, LI Y Y, et al. Determination of migration

quantity of bisphenol A from plasticpackaging materials of food[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(10): 2350-2355.

[3] 孙震,郭铮蕾,刘莉,等. 双酚 A 国内外管控法规和检测方法研究进展[J]. 中国口岸科学技术, 2017, 38(22): 38-44.
SUN Z, GUO Z L, LIU L, et al. Research progress on control regulations and detection technologies related to Bisphenol A at home and abroad[J]. China port science and technology, 2017, 38(22): 38-44.

[4] 食品安全国家标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准: GB 9685—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National food safety standard- Standard for the use of additives in Food contact materials and products: GB 9685—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.

[5] 合格评定 化学分析方法确认和验证指南: GB/T 27417—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
Comformity assessment-Guidance on validation and verification of chemical analytical methods: GB/T 27417—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.

[6] 化妆品中污染物双酚 A 的测定 高效液相色谱-串联质谱法: GB/T 30939—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
Determination of the contaminant bisphenol A in cosmetics- High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: GB/T 30939—2014[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。