

固相萃取-高效液相色谱-荧光 检测方便面中的苯并(a)芘

史海良

(国家食品质量监督检验中心,北京 100094)

摘要:采用固相萃取-高效液相色谱-荧光法(HPLC-FLD)测定方便面中苯并(a)芘的含量。根据不同的食品材质对样品提取条件进行优化,采用HiCapt-Benzo苯并(a)芘专用固相萃取柱净化,反相C₁₈(4.6mm×250mm, 5μm)色谱柱分离,外标法定量。苯并(a)芘在1.0~200μg/L浓度范围内线性关系良好,相关系数 $R^2=0.9998$ 。本方法的定量限(S/N≥10)在方便面调料中的调味油酱料包为0.5μg/kg,在调味粉料包、菜肉包和面饼都为0.1μg/kg;添加浓度为1.0~20μg/kg时,回收率范围为78.1%~96.7%,相对标准偏差(RSD)0.97%~6.23%(n=6)。该方法前处理简单,分析周期短,具有良好的灵敏度和精密度,适用于方便面中苯并(a)芘的测定。

关键词:苯并(a)芘,方便面,固相萃取,高效液相色谱,荧光检测

Determination of Benzo(a) pyrene in instant noodles by solid phase extraction-high performance liquid chromatography

SHI Hai-liang

(Nation Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: This thesis developed a HPLC method for Quick determination of the benzo(a) pyrene (BaP) level in the instant noodles with fluorescence detector. These samples were treated by the HiCapt-Benzo solid phase extraction (SPE) column, and then separated by the C₁₈ reversed-phase column (4.6mm×250mm, 5μm), quantified with the external standard method. It was showed a good linear relationship at a rang of 1.0~200μg/L, $R^2=0.9998$. The limit of detection was 0.5μg/kg in the flavored oil and 0.1μg/kg in the noodles. Linear plots were obtained between 1.0μg/L and 200μg/L. The recovery was 78.1%~96.7%, and RSD (n=6) was 0.97%~6.23%. The result showed that the method was sensitive, accurate, convenient and quick, which was suitable for the B(a) P determination in the instant noodles.

Key words: Benzo(a) pyrene; instant noodles; solid phase extraction; high-performance liquid chromatography; fluorescence detector

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0065-04

苯并(a)芘(BaP),是一种常见的高活性间接致癌物^[1]。苯并(a)芘(BaP)通过食物链在鱼类、植物和软体动物中发生生物蓄积,造成食物污染^[2]。方便面是指通过对面条进行蒸煮、油炸等工艺制得,再佐以油酱、菜肉、粉料等调料包,经过简单冲泡即可食用的即食食品。方便面原料受到污染或者不适当的油炸可能使方便面中的BaP含量升高^[3],2012年10月知名方便面品牌农心在韩国生产的6款方便面被卷入致癌物苯并(a)芘风波,消息引起各界高度关注。在食品苯并(a)芘的检测中,根据检测对象、富集提取方式的不同,使用的分析方法也不相同,主要有薄层层析法、荧光分光光度法、气相色谱法、气相色谱质谱法、高效液相色谱紫外法、高效液相色谱荧光

法^[4-9],其中荧光法灵敏度高,重现性好,是较常用的方法^[7-9]。目前,我国检测食品中苯并(a)芘的标准方法主要有GB/T5009.27, GB/T22509, NY/T1666, SC/T3041等,这些方法通常存在样品处理复杂、耗费试剂量大、检测周期长等局限性。本实验根据方便面中不同的食品材质,分别对方便面中的油酱料包,粉料、菜肉包和面饼采取不同的预处理方案,再用高效液相色谱荧光检测法进行检测,旨在建立一种试剂用量少、分离效果好、简便快速的方便面中苯并(a)芘的检测方法。本文采用HiCapt-Benzo苯并(a)芘专用固相萃取柱对基质较为复杂的方便面样品进行净化处理,有效排除基质干扰,再用高效液相色谱-荧光检测器(HPLC-FLD)测定,灵敏度高,重现性好,有利于方便面中苯并(a)芘的准确快速的定性定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苯并(a)芘标准品 中国计量科学研究院标物

收稿日期:2012-11-15

作者简介:史海良(1980-),男,硕士研究生,工程师,主要从事食品安全与营养的检验方面的研究。

中心; HiCapt-Benzo苯并(a)芘专用柱 维泰克科技有限公司; 乙腈 色谱纯; 水 超纯水, 正己烷, 丙酮, 乙酸乙酯, 异丙醇 分析纯。

Agilent1200 高效液相色谱仪配荧光检测器、Agilent SB-C₁₈ (4.6×250mm, 5μm) 色谱柱; TGL-16M 离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 高速分散机 IKA T18; 涡旋混合器 Vortex-Genie 2; 加压固相萃取装置 美国J2 scientific公司; N-EVAP111 氮吹仪 美国仪器集团; BP112s天平 赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 试剂处理 正己烷、丙酮、乙酸乙酯、异丙醇分别进行重蒸, 然后分别量取重蒸后的正己烷41.4mL、丙酮8mL和乙酸乙酯0.6mL混合后转移入旋转蒸发瓶中蒸发至近干, 然后再用氮气吹干, 最后用0.2mL重蒸后异丙醇溶解, 在液相荧光条件下检不出苯并(a)芘为合格(注: 以下实验所使用试剂皆为重蒸处理后试剂, 乙腈和水除外)。

1.2.2 提取流程

1.2.2.1 油酱料包预处理 40℃水浴溶解酱料包中的油脂, 然后准确称取0.4g(精确到0.0001g)左右样品置于5mL试管中, 然后用后正己烷2mL涡旋溶解, 等待净化。

1.2.2.2 粉料包, 菜肉包, 面饼预处理 准确称取初步粉碎的样品2g(精确到0.01g)左右置于50mL离心管中, 加入2g无水硫酸钠, 加入15mL正己烷, 匀浆处理2min, 超声提取5min, 6000r/min离心2min, 收集上清液置于50mL旋转蒸发瓶中, 然后再加入10mL正己烷溶解残渣, 重复上述过程两次, 合并正己烷提取液, 用旋转蒸发器40℃浓缩到1mL左右, 转移浓缩液到5mL试管中, 用0.5mL正己烷淋洗蒸发瓶, 合并溶液, 然后用正己烷定容到2mL, 等待净化。

1.2.3 净化 在HiCapt-Benzo柱中依次加入5mL丙酮, 2mL正己烷活化。在柱中正己烷液面为2mm时上样, 将1.2.2.1和1.2.2.2得到的待净化液加入HiCapt-Benzo柱中, 此过程注意不要使柱干涸, 再用200μL正己烷淋洗样品管, 一并加入SPE柱中, 流出液弃去。待上样液完全流出后, 用3mL的乙酸乙酯:正己烷=1:4(V/V)溶液淋洗, 淋洗液弃去, 将SPE柱吹干。然后用3mL丙酮解吸, 收集解吸液。解吸液40℃下用氮气吹干, 加入异丙醇200μL溶解并定容, 待液相色谱荧光检测。

1.2.4 液相色谱荧光检测 检测条件: 色谱柱: Agilent SB-C₁₈柱(4.6mm×250mm, 5μm); 流动相: 乙腈:水=88:12(V/V); 流速: 1.0mL; 柱温: 30℃; 进样量: 20μL; 荧光检测器: 激发波长384nm, 发射波长406nm。

2 结果与讨论

2.1 试剂处理的效果

在富含多环芳烃的石油和煤工业产品中不可避免的存在苯并(a)芘(图1), 检测苯并(a)芘中使用的大部分试剂都是石油和煤工业的产品, 如何清除试剂中苯并(a)芘对检测的干扰是一个必须要解决的问题, 否则就会造成假阳性、定量不准确、重复性差等结果的出现。苯并(a)芘熔点179℃, 沸点475℃, 因

此在重蒸馏的情况下可以完全的去掉试剂中的干扰(图2), 尽可能的保证结果准确可信。

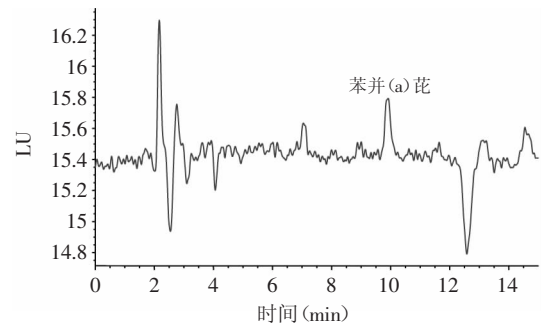


图1 未重蒸试剂色谱图

Fig.1 Chromatogram of not redistillation reagents

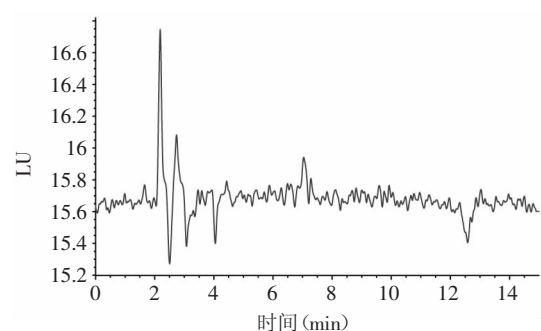


图2 重蒸后试剂色谱图

Fig.2 Chromatogram of redistillation reagents

2.2 提取溶剂的提取效率

实验中考察了石油醚、无水乙醚、正己烷和环己烷作为提取剂的提取效果(表1)。加标回收率实验发现正己烷和环己烷提取效果最好, 考虑到和净化步骤保持一致尽量减少使用试剂种类, 减少试剂处理的工作量, 降低试剂造成污染的可能性等因素, 最终选用正己烷作为苯并(a)芘提取试剂。

表1 提取试剂的提取效果

Table 1 Results of extraction reagents

试剂	添加水平(μg/kg)	回收率(%, n=6)
石油醚	1	48.7
	5	82.1
	10	80.6
无水乙醚	1	50.8
	5	66.7
	10	78.4
正己烷	1	79.8
	5	90.5
	10	93.6
环己烷	1	78.5
	5	90.6
	10	90.2

2.3 净化条件的选定

苯并(a)芘的检测中广泛使用的是中性氧化铝柱、佛罗里硅土固相萃取柱和C₁₈固相萃取柱^[9]。中性

氧化铝使用前处理耗时较长,对活性的控制较难掌握,因此重现性较差;弗罗里硅土和 C_{18} 固相萃取小柱,样品溶解上样后,用非极性试剂洗脱,也能取得良好的净化效果和回收率。但是这两种小柱在净化过程中引入其他不同于提取溶剂的试剂,使试剂的处理更加复杂化,并有可能影响检测结果。所以选用了HiCapt-Benzo苯并(a)芘专用柱,在有效去除油脂中的中性脂肪和维生素等基质干扰的同时,尽量简化净化方法使其简单、快速,使用溶剂与提取溶剂相一致,且回收率稳定、重现性良好。

2.4 液相色谱仪与荧光检测器的设定

实验参考GB/T22509的流动相组成,比较了不同比例的乙腈与水作流动相的效果,实验发现,乙腈的比例对目标物出峰时间影响比较大,乙腈比例较大时,洗脱能力较强,可以缩短苯并(a)芘的保留时间,但此时样品中其他杂质会发生重叠;减小乙腈比例可以改善样品溶液中各个色谱峰的分度,但苯并(a)芘的保留时间延长,操作费时。在本文实验条件下,当乙腈:水=88:12(V/V),流速为1.0mL/min,柱温30℃,荧光激发波长384nm,发射波长406nm时,苯并(a)芘出峰时间合适,峰形较好并能与基体杂质分开(图3、图4)。

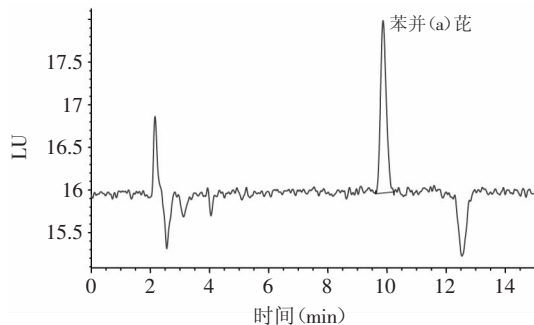


图3 苯并(a)芘(10.0 μ g/L)标准样品色谱图

Fig.3 Chromatogram of the Benzo(a) pyrene (10.0 μ g/L) standard solution

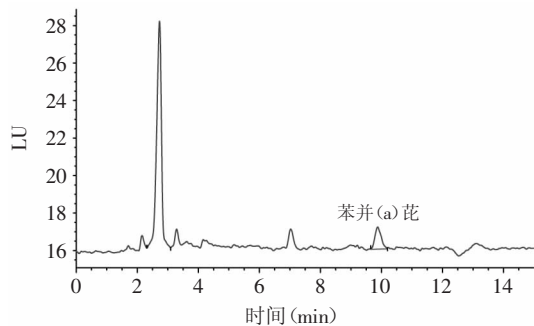


图4 苯并(a)芘阳性样品色谱图

Fig.4 Chromatogram of the Benzo(a) pyrene in positive sample

2.5 方法的线性范围、定量限、回收率和精密度

在1.0~200 μ g/L浓度范围内,分别配制苯并(a)芘浓度为1.0、5.0、20、50、100、200 μ g/L的标准溶液,以峰面积(Y)与苯并(a)芘浓度(X, μ g/L)绘制标准工作曲线。结果表明,在1.0~200 μ g/L浓度范围内,苯并(a)

芘呈良好线性关系,线性方程 $Y=2.582X+1.410$,相关系数(R^2)为0.9998,测定低限($S/N \geq 10$)油料包为0.5 μ g/kg,粉料包和面饼0.1 μ g/kg。

选择空白方便面样品(图5),在优化后的实验条件下,对方便面样品进行加标回收率实验,苯并(a)芘的加标浓度选为高中低三个浓度分别为1.0、5、20 μ g/kg,每个水平进行6次平行实验,各加标浓度的回收率和精密度见表2。结果表明,添加浓度1.0~20 μ g/kg时,回收率范围78.1%~96.7%,相对标准偏差0.97%~6.23%,符合苯并(a)芘检测的要求。

表2 空白方便面中样品中苯并(a)芘加标回收率和和相对标准偏差($n=6$)

Table 2 Recoveries and RSD of Benzo(a) pyrene in the instant noodles ($n=6$)

样品	添加浓度(μ g/kg)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
酱料包	1.0	80.6	4.52
	5.0	93.1	2.61
	20.0	96.7	0.97
面饼	1.0	78.1	6.23
	5.0	90.4	3.17
	20.0	93.8	1.24

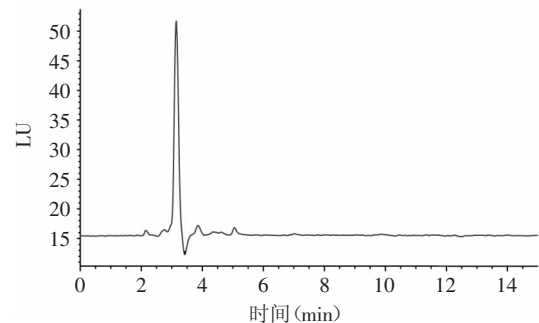


图5 苯并(a)芘空白样品图

Fig.5 Chromatogram of the Benzo(a) pyrene in blank sample

3 结论与讨论

方便面中的苯并(a)芘来源有两个可能的途径:一是原料受到污染,主要是调味油酱、调味粉料等容易带入;二是在生产过程中不适当的油炸有可能使面饼中的苯并(a)芘含量升高;针对动植物油脂和肉类的苯并(a)芘检验方法比较多,主要有皂化法、固相萃取法、液液萃取法等^[10],针对面条等粮食制品中的苯并(a)芘检验方法较少主要是液液萃取法^[5],本文同时针对方便面中苯并芘不同的来源采用不同的提取方法,然后采用相同的净化条件既充分保证提取的效率,又兼顾了实验室工作的效率。苯并(a)芘检测的难点在于有效的排除干扰,干扰包括使用试剂带入和样品基质中固有两部分,试剂处理是苯并(a)芘检测排除假阳性的一个关键性步骤,在一些试剂中曾发现苯并(a)芘含量甚至超过食品标准限量的现象,同时样品前处理的结果将直接影响检测结果的准确性和可靠性。本研究中所有试剂都经过处

(下转第73页)

- [9] Alf Harbitz. Estimation of shrimp (*Pandalus borealis*) carapace length by image analysis[J]. Oxford Journals, 2007, 12(2): 939-944.
- [10] Soleiman Hosseinpour, Shahin Rafiee, Seyed Saeid Mohtasebi. Application of image processing to analyze shrinkage and shape changes of shrimp batch during drying technology[J]. An International Journal, 2011, 29(12): 1416-1438.
- [11] Diego A Luzuriaga, Murat O Balaban, Sencer Yeralan. Analysis of visual quality attributes of white shrimp by machine vision[J]. Journal of Food science, 1997, 62(1): 113-118.
- [12] 刘小林, 吴长功, 张志怀. 凡纳对虾形态性状对体重的影响效果分析[J]. 生态学报, 2004, 24(4): 858-862.
- [13] 杨长明, 何铜. 凡纳对虾形态性状对体质量的逐步回归分析[J]. 西北农业学报, 2011, 20(2): 15-20.
- [14] SN/T2920-2011. 进出口水产品检验规程[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [15] 冈萨雷斯, 伍兹. 数字图像处理[M]. 第二版. 北京: 电子工业出版社, 2009.
- [16] Ying-Jen Huang, Fang-Fan Lee. An automatic machine vision-guided grasping system for phalaenopsis tissue culture plantlets[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2010, 70: 42-51.
- [17] Cheryl McCarthy, Nigel Hancock, Steven Raine. On-the-go machine vision sensing of cotton plant geometric parameters: first results[J]. Mechatronics and Machine Vision in Practice, 2008(6): 305-312.
- [18] Simonton W, Pease J. Automatic plant feature identification on geranium cuttings using machine vision[J]. Transactions of the ASAE, 1990, 33(6): 2061-2073.
- [19] 李明, 张长利, 王晓楠. 基于图像处理技术的小麦形态检测方法研究[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(4): 111-115.
- [20] Kun Bin, Huang Fei-fei, Wang Cheng. Automatic acquisition characteristic parameters of wheat ear based on machine vision [C]. 2011 International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, 2011: 148-155.
- [21] 周曼, 周明全. 基于BP神经网络的水稻害虫自动识别[J]. 北京师范大学学报, 2008, 44(2): 165-167.
- [22] 吴长高, 罗锡文. 计算机视觉技术在根系形态和构型分析中的应用[J]. 农业机械学报, 2000, 31(3): 63-66.
- [23] Wang Chuanyu, Guo Xinyu, Zhao Chunjiang. Detection of corn plant population and row spacing using computer vision[J]. 2011 Second International Conference on Digital Manufacturing & Automation, 2011: 405-409.
- [24] 李文彬, 阚江明, 孙仁山. 立木枝杈点自动识别方法[J]. 北京林业大学学报, 2007, 29(4): 1-4.
- [25] P P Ling, S W Searcy. Feature extraction for a machine-vision-based shrimp deheader[J]. American Society of Agricultural Engineers, 1991, 34(6): 3406-2631.
- [26] Domingo Mery, Iván Lillo, Hans Loebel. Automated Fish Bone Detection Using X-ray Imaging[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 105: 485-492.
- [27] 潘鹏昊, 李建平, 傅立. 虾仁图像细化曲线长度与体重相关性研究[J]. 农业机械学报, 2009, 40(3): 172-175.
- [28] 许晓燕, 夏顺仁. 基于Hough变换的斑马鱼胚胎图像分析技术[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2009, 43(11): 2034-2037.
- [29] 吴选忠. Zhang快速并行细化算法的扩展[J]. 福建工程学院学报, 2006, 4(1): 89-92.
- [30] 秦筱斌, 蔡超, 周成平. 一种有效的骨架毛刺去除算法[J]. 华中科技大学学报, 2004, 32(12): 28-31.
- [31] 唐瑶, 张锡哲, 王钰旋. 一种中国书法作品骨架提取算法[J]. 工程图学学报, 2006, 27(5): 98-104.
- [32] 姜泳水, 唐金辉, 陈学俭. 二值图像中物体几何主轴的提取方法[J]. 计算机工程, 2005, 31(18): 57-58.

(上接第67页)

理, 并且检验合格, 保证实验所使用试剂不会对检验结果形成干扰和影响; 样品经匀浆、超声萃取、离心分离上清, 再经苯并(a)芘专用固相萃取柱净化, 有效排除了中性脂肪和维生素等基质因素对目标峰的干扰, 得到的色谱图背景干净, 色谱峰形好。该法样品前处理比较简单, 分离效果好, 且准确性和重复性好, 满足于方便面中苯并(a)芘含量的测定, 各项技术指标均符合检测要求。

参考文献

- [1] 李永红, 金银龙. 苯并(a)芘致癌机制研究新进展[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(8): 152-154.
- [2] 李永和. 3-4苯并芘(BaP)对粮食及食品的污染[J]. 粮食科技与经济, 1997(4): 37-38.
- [3] 赵月兰, 秦建华. 苯并芘对动物性食品的污染与检测[J]. 中国动物检疫, 1996, 3(2): 15.
- [4] 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.
- [5] 王浩, 杨红梅. 高效液相色谱法测定粮食中苯并芘残留的研究[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(1): 53-54.
- [6] 李先国, 阎国芳, 周晓, 等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定海水中的多环芳烃[J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39(5): 1087-1092.
- [7] 李春蕊, 梁春群, 陈同欢, 等. 荧光光度法测定食用油中的苯并(a)芘[J]. 化工技术与开发, 2008, 37(2): 37-42.
- [8] 柯华, 林捷, 郑申西. 凝胶净化-高效液相色谱法测定油脂中苯并(a)芘[J]. 中国卫生检杂志, 2010, 20(2): 265-266.
- [9] 杨燕, 付亚群, 吴晓萌, 等. 固相萃取-高效液相色谱法分析食用油中的苯并芘[J]. 山东大学学报: 医学版, 2012, 50(8): 124-127.
- [10] 俞晔, 金青哲, 刘海珍, 等. 食用油脂中多环芳烃检测的前处理技术研究进展[J]. 中国油脂, 2011, 36(7): 1-4.