

高效液相色谱-二极管阵列检测器-荧光检测器法测定植物油中的18种多环芳烃

王峰¹, 张志杰¹, 林慧¹, 仓义鹏^{2,*}

(1.江苏省产品质量监督检验研究院, 江苏 南京 210007; 2.宿迁市产品质量监督检验所, 江苏 宿迁 223800)

摘要: 建立凝胶渗透色谱法净化样品、高效液相色谱-二极管阵列串联荧光检测器法同时测定植物油中18种多环芳烃的检测方法。样品经环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)溶解, 利用凝胶渗透色谱法去除油脂大分子, PAH C₁₈柱分离, 乙腈和水作流动相进行梯度洗脱, 设置荧光检测程序, 以2个发射波长通道同时采集数据, 测定油样中的17种多环芳烃, 以二极管阵列检测器测定苊烯。结果表明: 方法检出限为0.5~4 ng/mL, 样品回收率在78.65%~103.4%之间, 相对标准偏差小于5%。本方法满足德国标准对18种多环芳烃的同步检测新要求。

关键词: 植物油; 多环芳烃; 高效液相色谱; 荧光检测器

Determination of 18 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Vegetable Oil by High Performance Liquid Chromatography with Diodearray Detector and Fluorescence Detector

WANG Feng¹, ZHANG Zhi-jie¹, LIN Hui¹, CANG Yi-peng^{2,*}

(1. Jiangsu Provincial Supervising & Testing Research Institute for Product Quality, Nanjing 210007, China;
2. Suqian Product Quality Supervision and Testing Institute, Suqian 223800, China)

Abstract: A method has been developed for the simultaneous determination of 18 polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil by gel permeation chromatography (GPC) and high performance liquid chromatography with diodearray detector and fluorescence detector (HPLC-DAD-FLD). The samples were dissolved in cyclohexane-ethyl acetate (1:1, V/V), then purified with GPC to remove grease molecules, and separated on a PAH C₁₈ column using acetonitrile and water as the mobile phase with gradient elution. Subjected to 2-wavelength channel data acquisition setting with fluorescence procedure, 17 kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil samples were determined. Data acquisition of acenaphthylene was achieved by DAD detector. The detection limit of this method was 0.5–4 ng/mL. The average recovery rate in oil was in the range of 78.65%–103.4% with relative standard deviation (RSD) of less than 5%. This method was satisfactorily used for the simultaneous detection of 18 kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in edible oil, while meeting the new detection requirements of Germany standards for these PAHs.

Key words: vegetable oil; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence detector

中图分类号: TS202.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)06-0142-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201406030

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是由2~7个苯环组成的芳香族化合物, 属强致癌、持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)。多环芳烃可损伤生殖系统, 导致皮肤癌、肺癌等癌症, 具有致畸和致突变性^[1-2]。目前世界各国对多环芳烃都有严格限制, 美国环境保护署将16种多环芳烃列入优先控制污染物名单^[3]; 欧洲食品安全局和德意志研究

联合会参议院认定2种剧毒多环芳烃, 苯并(j)荧恩和苯并(e)芘, 为第2类致癌物质, 并将其增加到欧盟化学品注册、评估、许可和限制法规附录XVII(第50项)进行管制^[4]。德国GS认证已将管控的多环芳烃种类由16种增加为18种^[5-6]。我国对水、食用油、熏烤肉和粮食中的苯并(a)芘也有严格限量规定^[7]。

目前, 对多环芳烃的检测集中于早期标准规定的

收稿日期: 2013-12-13

基金项目: 江苏省质量技术监督局项目(KJ133810); 苏州市常熟市科技局社会发展项目(CS201306)

作者简介: 王峰(1976—), 女, 高级工程师, 博士, 研究方向为食品检验。E-mail: wdyinch05@hotmail.com

*通信作者: 仓义鹏(1974—), 男, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: yipengcang@163.com

16 种多环芳烃, 对新要求的 18 种多环芳烃的测定鲜有报道。检测方法主要有分光光度法^[8]、气相色谱-质谱联用 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 法^[9-12]、高效液相色谱-荧光检测器 (high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD) 法^[13-14]。其中, 分光光度法仅适用于蒽、1,2-苯并蒽、苯并 (a) 芘等少数多环芳烃的测定, 且基质干扰较大, 但对仪器设备要求较低、检测费用低。GC-MS 法引入特征碎片离子, 对多组分具有较好的检测能力, 但二苯并 (a,h) 蒽、苯并 (g,h,i) 芘的沸点高达 525 °C^[15-16], 容易造成污染, 并且苯并 (j) 荧蒽、苯并 (b) 荧蒽和苯并 (k) 荧蒽这 3 种苯并荧蒽难以分离, 重质多环芳烃的回收率较低^[17-18]。HPLC-FLD 法的检出限较低, 且具有较高的选择性^[19], 但对 18 种多环芳烃的同步分离, 尤其是同分异构体苯并 (e) 芘和苯并 (j) 荧蒽的分离效果欠佳, 并且受食用油的基质干扰较严重。

本研究利用凝胶渗透色谱 (gel permeation chromatography, GPC) 去除植物油中大分子的干扰、高效液相色谱-二极管阵列检测器-荧光检测器 (HPLC-diodearray detector-FLD, HPLC-DAD-FLD) 法, 建立了植物油中18种多环芳烃的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物油 市售；乙腈、环己烷、丙酮、乙酸乙酯
(均为色谱纯) 美国Tedia公司。

1.2 仪器与设备

1260型高效液相色谱仪（配有二极管阵列检测器、
荧光检测器） 美国Agilent公司；凝胶渗透净化色谱仪
德国LCTech公司；艾科浦超纯水机 重庆颐洋企业发
展有限公司。

18种多环芳烃混合标准物质：萘、蒽、苊、芘、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并(a)蒽、屈、苯并(j)蒽、苯并(e)芘、苯并(b)蒽、苯并(k)蒽、苯并(a)芘、二苯并(a,h)蒽、苯并(g,h,i)芘、茚并(1,2,3-c,d)芘，质量浓度均为1 μg/mL 美国o2si公司。

1.3 方法

1.3.1 样品净化

考察固相萃取（填料为中性氧化铝）法和GPC法净化植物油样品的净化效果。固相萃取法：参照GB/T 22509—2008《动植物油脂：苯并（*a*）芘的测定》^[20]；GPC法：植物油样中加入18种多环芳烃标准溶液，设定流速为5 mL/min，分20个小瓶收集，每瓶收集2 min，通过分段收集和荧光分析，以确定18种多环芳烃的洗脱时间。

1.3.2 样品前处理

称取1 g植物油样品于10 mL试管中,以乙酸乙酯-环己烷(1:1, *V/V*)定容后,充分混匀,将稀释液转移至GPC配备的样品瓶中,进行净化,将收集的洗脱液用N₂吹至近干,以乙腈定容至1 mL,过0.22 μm有机相滤膜后待测。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: Eclipse PAH C₁₈柱 (4.6 mm×50 mm, 1.8 μm); 柱温18℃; 流动相: 水和乙腈, 梯度洗脱程序; 进样量10 μL; 流速1.0 mL/min; 检测器: DAD (230 nm) 和FLD。由于18种多环芳烃的最佳激发波长和发射波长各不同, 而每台仪器的最佳波长参数又略有不同, 因此根据所使用仪器的扫描结果结合文献[21-23], 确定各个物质的最佳激发波长和发射波长。

1.3.4 方法的回收率和精密度

取大约40 g植物油至圆底烧瓶中，加入2 g活性炭，旋转蒸发仪中90 ℃加热2 h，离心后上层清液过0.45 μm滤膜，作为空白样品，添加18种多环芳烃标准品至其质量浓度为5 μg/kg，按优化后的方法平行测定6次，计算平均回收率和精密度。

2 结果与分析

2.1 样品前处理优化

比较了氧化铝固相萃取小柱和GPC法对植物油样品的净化效果。结果发现,采用氧化铝固相萃取柱净化油样,对多环芳烃中最常检测的BaP影响不大,但对前10 min出峰的轻质多环芳烃(Naph、Acy、Ace、Flu、Phe、Ant、Fla和Pyr)影响特别大。主要原因是测定BaP时,采用的激发波长(λ_{ex})为384 nm,发射波长(λ_{em})为406 nm;而测定前10 min出峰的多环芳烃时,采用的激发波长为260 nm,导致样品中部分杂质出峰形成干扰,因而以中性氧化铝为填料的固相萃取小柱不适用于多环芳烃检测。而经GPC净化的样品,有效去除了植物油中的大分子干扰物质,在24~50 min内可以将18种多环芳烃收集完全,故本实验采用GPC净化食用油样品^[5]。

2.2 检测波长的选择

18种多环芳烃的检测波长见表1。Acy基本无荧光吸收,用DAD检测。

BjF和BeP是同分异构体, 难以用Eclipse PAH C₁₈柱分离。在 $\lambda_{\text{Ex}}=315\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{Em}}=512\text{ nm}$ 处, BeP无荧光峰, 而BjF有很强的荧光峰; 在 $\lambda_{\text{Ex}}=315\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{Em}}=400\text{ nm}$ 处, BjF无荧光峰, 而BeP有很强的荧光峰(图1)。因此可以利用 $\lambda_{\text{Ex}}=315\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{Em}}=512\text{ nm}$ 和 $\lambda_{\text{Ex}}=315\text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{Em}}=400\text{ nm}$ 的2个荧光波长通道分别进行测定, 解决BjF和BeP 2种物质较难分离的问题^[25]。

表 1 18 种多环芳烃的荧光波长
Table 1 Fluorescence wavelengths of 18 PAHs

序号	中文名	缩写	保留时间/min	激发波长/nm	发射波长/nm
1	萘	Naph	2.34	260	325
2	苊烯	Acy	2.61	—	—
3	苊	Ace	4.14	260	325
4	芴	Flu	4.61	260	315
5	菲	Phe	5.82	260	370
6	蒽	Ant	6.96	260	405
7	荧蒽	Fla	7.90	260	450
8	芘	Pyr	8.49	260	390
9	苯并(a)蒽	BaA	10.67	260	400
10	屈	CHR	11.22	260	375
11	苯并(j)荧蒽	BjF	12.35	315	400
12	苯并(e)芘	BeP	12.35	315	520
13	苯并(b)荧蒽	BbF	12.77	260	440
14	苯并(k)荧蒽	BkF	13.83	260	440
15	苯并(a)芘	BaP	14.42	260	420
16	二苯并(a,h)蒽	DhA	16.27	260	420
17	苯并(g,h,i)芘	BgP	16.65	260	420
18	茚并(1,2,3-c,d)芘	IcP	17.85	315	512

注：—，无最佳激发和发射波长。

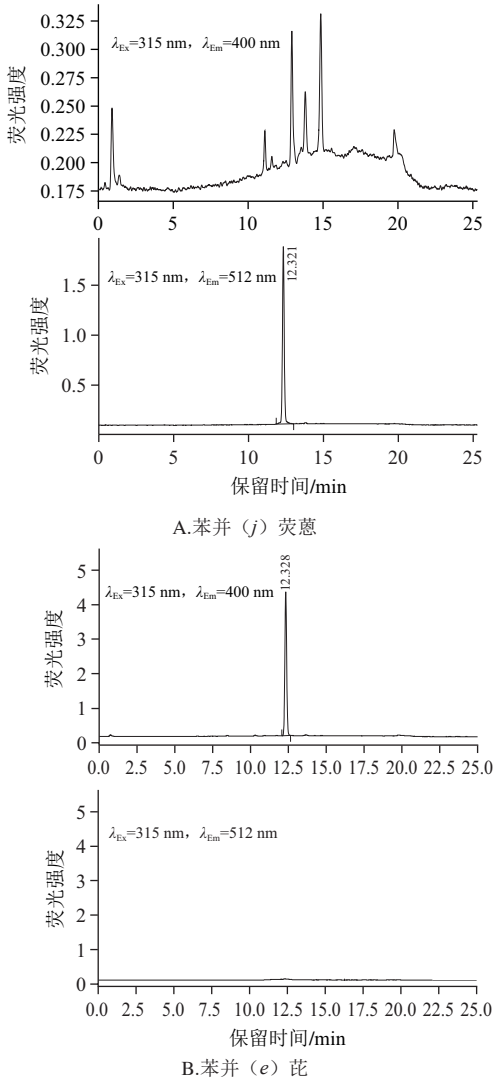


图 1 不同荧光发射波长下苯并(j)荧蒽和
苯并(e)芘的色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of benzo(j) fluoranthene and benzo(e) pyrene at different fluorescence emission wavelengths

采用多发射波长模式，测定18种多环芳烃。将检测波长设为2个通道：一个通道 $\lambda_{Ex}=315\text{ nm}$ 、 $\lambda_{Em}=400\text{ nm}$ ，测定BeP；另一个通道，根据各物质的最佳激发、发射波长（表1）和保留时间设置荧光检测程序，测定其余16种多环芳烃。

2.3 柱温

不同的柱温对多环芳烃分离度和出峰时间有一定影响。在保持梯度洗脱条件、色谱柱和检测波长不变的情况下，分别设置3个不同的柱温（18、15℃和25℃），比较不同柱温对色谱峰的分离度和出峰时间的影响。结果表明，随柱温的升高，出峰时间缩短、分离度变差。综合考虑，采用18℃的柱温。

2.4 梯度洗脱条件的选择

乙腈和水的不同配比直接影响多环芳烃出峰的时间。本实验中，乙腈含量的比例高时，出峰较快，但Ace和Flu，BjF、BeP和BbF，DhA和BgP都难以分离开。经过优化，设置梯度洗脱程序为：A相为水，B相为乙腈，0~3.5 min，55% B；3.5~10 min，55%~90% B；10~15.5 min，90%~100% B；15.5~18 min，100% B；18~20 min，100%~55% B；20~22 min，55% B。在该梯度洗脱程序下，多环芳烃取得较好分离（图2），各个组分的保留时间见表1。

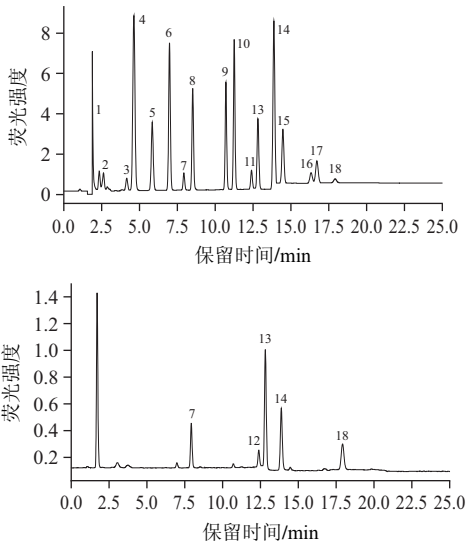


图 2 18 种标准物质的荧光色谱图

Fig.2 Fluorescence chromatograms of 18 PAH standards

2.5 线性范围及检出限

以乙腈为溶剂，配制质量浓度为0.5、1、4、10、50 ng/mL的18种多环芳烃混合标准系列工作液，按照优化的实验条件进行测定。以各组分的峰面积（y）为纵坐标，质量浓度（x）为横坐标，绘制标准曲线。结果表明，Flu、Phe、Ant、Pyr、BaA、CHR、BbF、BkF和BaP线性范围为0.5~50 ng/mL；Naph、Ace、Fla、BjF、

BeP、DhA、BgP和IcP线性范围为1~50 ng/mL; Acy线性范围为4~50 ng/mL。本法线性范围很宽, 但实际植物油样品中多环芳烃的含量较低, 因此需要根据实际情况确定线性范围、绘制标准曲线。

配制接近方法检出限的标准样品, 重复测定7次, 以信噪比为3时对应质量浓度作为18种多环芳烃的方法检出限, 结果见表2。

2.6 方法的回收率和精密度

表2 各化合物的线性范围、线性方程、相关系数、添加回收率及检出限

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients, spike recoveries and limits of detection

名称	线性方程	线性范围/ (ng/mL)	相关 系数	回收 率/%	检出限/ (ng/mL)
Naph	$y=0.702x-0.12$	1~50	0.992	83.15	1
Acy	$y=0.832x-0.52$	4~50	0.990	78.65	4
Ace	$y=0.516x+0.04$	1~50	0.995	81.25	1
Flu	$y=8.63x+0.9$	0.5~50	0.996	84.20	0.5
Phe	$y=3.08x+0.1$	0.5~50	0.995	85.13	0.5
Ant	$y=6.024x-2.54$	0.5~50	0.996	88.24	0.5
Fla	$y=0.648x+0.12$	1~50	0.997	89.75	1
Pyr	$y=0.88x-0.4$	0.5~50	0.996	99.75	0.5
BaA	$y=3.802x-0.22$	0.5~50	0.998	95.90	0.5
CHR	$y=5.28x+0.6$	0.5~50	0.995	88.70	0.5
BjF	$y=0.876x-0.76$	1~50	0.992	93.65	1
BeP	$y=3.05x-1$	1~50	0.991	93.65	1
BbF	$y=6.89x+2.3$	0.5~50	0.997	90.05	0.5
BkF	$y=2.874x-3.44$	0.5~50	0.997	90.75	0.5
BaP	$y=0.702x-0.12$	0.5~50	0.996	101.4	0.5
DhA	$y=1.49x-1.6$	1~50	0.998	94.05	1
BgP	$y=0.648x+0.12$	1~50	0.997	103.4	1
IcP	$y=0.702x-0.12$	4~50	0.993	84.15	1

由表2可知, 18种多环芳烃的方法检出限为0.5~4 ng/mL, 平均回收率在78.65%~103.4%。方法的相对标准偏差为0.9%~4.5%, 方法精密度良好。

2.7 实际样品分析

采用所建立的方法, 对10种市售品牌食用植物油进行分析。结果表明, 10份食用植物油样本中, 只有Acy和Ace没有检出, 其余均有检出。10份食用植物油样本中的18种多环芳烃总含量最低为1.2 μg/kg, 最高为201.52 μg/kg, 大多数样品的含量为30 μg/kg左右。

3 结论

采用HPLC-DAD-FLD方法, 可在25 min内完成18种多环芳烃的测定。结果表明, 该方法检测效率高、线性范围宽、检出限低、实用性强, 可用于植物油中18种多环芳烃的检测。本方法满足德国标准对18种多环芳烃同步检测的新要求。

参考文献:

- [1] US Environmental Protection Agency (USEPA). Guidelines for carcinogen risk assessment: EPA/630/P03/001F[R]. Washington, DC: USEPA, 2005.
- [2] NAKATA H, UEHARA K, GOTO Y, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in oysters and sediments from the Yatsushiro Sea, Japan: Comparison of potential risks among PAHs, dioxins and dioxin-like compounds in benthic organisms[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 99(2): 61-68.
- [3] US Environmental Protection Agency(USEPA). Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution: EPA-540/5-83-006[R]. Washington, DC: USEPA, 1984.
- [4] OLIVER KRÜGER, UTE KALBE, KERSTIN MEISSNER, et al. Sorption effects interfering with the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aqueous samples[J]. Talanta, 2014, 122(5): 151-156.
- [5] 宁波出入境检验检疫局. GS标志物质列表中将新增两种多环芳烃[EB/OL]. (2011-11-09). [2011-11-09]. http://www.wtociq.gov.cn/ckyj/csyj/201311/t20131102_84049.shtml.
- [6] Zentralstelle der Länder für Sicherheitstechnik (ALS). ZEK01.4-08 Testing and evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the GS-Mark Certification[S]. Central Experience Exchange Office, ZEK: Germany, 2011.
- [7] 卫生部. GB 2762—2012 食品安全国家标准: 食品中污染物限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [8] 於立军, 李耀群, 睦蔚. 多环芳烃的Shpol' skii低温荧光光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(5): 819-821.
- [9] 王建华. 不同加工过程花生油中16种多环芳烃(PAHs)的含量变化[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 183-187.
- [10] 尹怡, 郑光明, 朱新平, 等. 分散固相萃取/气相色谱-质谱联用法快速测定鱼、虾中的16种多环芳烃[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1107-1112.
- [11] 杨家锋, 钟惠英, 段青源, 等. 气相色谱-质谱联用法测定水产品中16种多环芳烃[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(10): 2291-2295.
- [12] AGUINAGA N, CAMPILLO N, VIÑAS P, et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 596(2): 285-290.
- [13] 罗世榕. 高效液相色谱荧光法测定土壤中16种多环芳烃[J]. 福建分析测试, 2010, 19(2): 69-72.
- [14] 张志伟, 朱琳, 刘华良, 等. 供体受体复合色谱法测定植物油中16种欧盟优控多环芳烃[J]. 中国油脂, 2012, 37(3): 74-77.
- [15] 国家认证认可监督管理委员会. SN/T 1877.2—2007 塑料原料及其制品中多环芳烃的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] 房丽萍, 吴忠祥, 王伟, 等. 河流沉积物多环芳烃标准样品的制备与定值[J]. 岩矿测试, 2013, 32(5): 767-774.
- [17] WINDAL I, BOXUS L, HANOT V. Validation of the analysis of the 15+1 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons by donor-acceptor complex chromatography and high-performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1212(1): 16-22.
- [18] VEYRAND B, BROSSEAU A, SARCHER L, et al. Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1149(1): 333-344.
- [19] SIMON R, PALME S, ANKLAM E. Validation (in-house and collaborative) of a method based on liquid chromatography for the quantitation of 15 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke flavourings: HPLC-method validation for 15 EU priority PAH in smoke condensates[J]. Food Chemistry, 2007, 104(2): 876-887.
- [20] 全国粮油标准化技术委员会. 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]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [21] 全国粮油标准化技术委员会. GB/T 24893—2010 动植物油脂: 多环芳烃的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [22] 环境保护部科技标准司. HJ 647—2013 环境空气和废气: 气相和颗粒物中多环芳烃的测定: 高效液相色谱法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2013.
- [23] 陆晓梅, 王炳玲, 张晓玲, 等. 高效液相色谱编程荧光法测定室尘中痕量多环芳烃[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(10): 1521-1526.
- [24] 马君刚, 张焯涛, 于红, 等. GPC-HPLC-FLD法测定动植物油脂中的苯并(a)芘[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 278-281.
- [25] 何乔桑, 鹿燕, 廖上富, 等. 应用二极管阵列串联荧光检测-高效液相色谱技术快速测定玩具材料中葱油的4种成分[J]. 色谱, 2013, 31(5): 435-440.