

## 实验技术与方法

## 改进固相萃取-高效液相色谱法测定食用油中苯并(a)芘

薛昆鹏<sup>1</sup>, 吴韶铭<sup>2</sup>, 陈宗良<sup>2</sup>, 余冲<sup>1</sup>, 张勇<sup>1</sup>, 姚立新<sup>1</sup>, 赵岳星<sup>1,3</sup>(1. 浙江月旭材料科技有限公司, 浙江 金华 321014; 2. 金华市食品药品检验所, 浙江 金华 321000;  
3. 浙江师范大学物理化学研究所, 浙江 金华 321004)

**摘要:**目的 建立改进固相萃取-高效液相色谱-荧光检测器检测食用油中苯并(a)芘的方法。方法 以中性氧化铝作为食用油固相萃取前处理净化填料。样品经中性氧化铝固相萃取柱前处理净化后采用 Ultimate<sup>®</sup> XB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (88:12, V/V) 为流动相, 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μl, 在激发波长 384 nm、发射波长 406 nm 处进行检测。试验过程中重点考察了不同含水量的中性氧化铝对油脂的去除效果和苯并(a)芘的回收率效果, 最终筛选出含水量为 6% 的中性氧化铝作为检测食用油中苯并(a)芘的专用前处理净化填料。结果 本方法的检出限为 0.5 ng/g, 线性范围 0.5 ~ 100 ng/ml, 加标回收率在 91.2% ~ 101.0% 之间, 相对标准偏差在 2.2% ~ 2.9% 之间。结论 该方法灵敏度高, 选择性好, 定量准确, 适用于食用油中苯并(a)芘的准确检测。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱法; 荧光检测器; 食用油; 苯并(a)芘; 食品安全; 食品污染物

中图分类号: R155; TS207.3; TS225 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0140-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.010

### Detemination of benzo(a) pyrene level in cooking oil by improved solid phase extraction-high performance liquid chromatography

XUE Kun-peng, WU Shao-ming, CHEN Zong-liang, YU Chong, ZHANG Yong,  
YAO Li-xin, ZHAO Yue-xing

(Welch Materials (Zhejiang), Inc., Zhejiang Jinhua 321014, China)

**Abstract: Objective** To establish an improved solid phase extraction-high performance liquid chromatography method with fluorescence determination for the detection of benzo(a) pyrene (B(a)P) in cooking oil. **Methods** Cooking oil samples were prepared by neutral alumina solid phase extraction (SPE) column. This study investigated the effect of grease removal and recovery of B(a)P as a function of water content in the neutral alumina packing. Neutral alumina packing with 6% water content was found to be the best solid phase extraction packing for B(a)P pre-treatment. In the HPLC method, the HPLC column used was Ultimate<sup>®</sup> XB-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column from Welch Materials, Inc. The mobile phase was acetonitrile-water (88:12, V/V) with a flow rate of 1.0 ml/min, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μl. **Results** The limit of determination was 0.5 ng/g (S/N = 3), the linear range was 0.5-100 ng/ml, the recoveries were 91.2% -101.0% and the relative standard deviations were 2.2% -2.9%. **Conclusion** The method is highly sensitive with good selectivity and accurate quantification, which is suitable for B(a)P determination in cooking oil.

**Key words:** Solid phase extraction; high performance liquid chromatography; fluorescence detector; cooking oil; benzo(a)pyrene; food safety; food contaminants

苯并(a)芘(benzo(a)pyrene), 是一种五环芳香烃类化合物, 其在体内的代谢物二羟环氧苯并芘是有致癌性的物质。食用油的生产工艺过程中由于

温度控制不当会产生一定量的苯并(a)芘, 散装食用油最为突出; 另外, 经过多次使用的高温植物油、煮焦的食物、油炸过度的食品都会产生苯并(a)芘。目前“地沟油”已经成为一个非常严重的食品安全问题, “地沟油”重要的来源之一就是反复高温煎炸食物的老油。因此, 食用油中苯并(a)芘的检测需引起人们的高度重视<sup>[1]</sup>。

目前, 我国检测食品中苯并(a)芘最新的国标测定方法为 GB/T 22509—2008《动植物油脂 苯并(a)

收稿日期: 2014-12-17

基金项目: 金华市科技计划项目(2013-1-020)

作者简介: 薛昆鹏 男 工程师 研究方向为食品安全检测

E-mail: kunpengxue@welchmat.com

通讯作者: 赵岳星 男 教授级高工 研究方向为药物分析和食品安全检测 E-mail: eugenezhao@welchmat.com

芘的测定 反相高效液相色谱法》<sup>[2]</sup>,该方法存在操作时间长、试剂消耗大、回收率不稳定以及对试剂和人员要求比较高等问题<sup>[3-5]</sup>,导致很多基层检验机构不能较好地应用该方法对食用油中苯并(a)芘进行有效、准确的检测。而相关研发机构开发的一些新的固相萃取(SPE)前处理检测方法又存在油脂去除不完全,重现性不够理想等问题<sup>[6-8]</sup>。本试验根据不同含水量的中性氧化铝对不同极性的物质吸附保留净化能力不同的原理,对食用油样品进行前处理净化,筛选出最佳含水量的中性氧化铝作为植物油苯并(a)芘前处理净化专用填料,再利用高效液相色谱-荧光检测法进行测定,旨在建立一种分离效果好、简便快速的苯并(a)芘的检测方法,并用于市场上监督实际食用油样品中苯并(a)芘的含量。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

食用油样品购自于金华市区农贸超市的桶装食用油。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪(配备二元高压系统、柱温箱、荧光检测器等,日本岛津),12位固相萃取仪,固相萃取柱:不同含水量的中性氧化铝固相萃取小柱(22 g/60 ml,填料处理方式:将90 g经450℃灼烧12 h、目数为100~200的中性氧化铝放入密闭容器中降至室温,加入不同体积的超纯水,剧烈摇晃容器15 min,静置平衡24 h,室温下抽真空密封避光保存,装柱时即开即用,因为中性氧化铝的吸水性较强,长时间暴露在空气中容易进一步吸水)。

苯并(a)芘标准品(CDGG-010020-01,纯度≥98%,国家标准物质研究中心),乙腈、四氢呋喃均为色谱纯(美国Merck),超纯水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品处理

将0.3 g食用油样品置于15 ml离心管,加入5.0 ml正己烷,涡旋充分混匀,待净化。

#### 1.2.2 样品SPE净化

样品的SPE净化分为以下4个步骤:①活化:往中性氧化铝固相萃取柱中加入约30 ml正己烷,流出液弃去;②上样:将1.2.1步骤中所得的提取液加入中性氧化铝柱中,收集过柱流出液于旋转蒸发瓶中;③洗脱:将80 ml正己烷分四次洗脱,收集洗脱液于旋转蒸发瓶中,整个固相萃取过程不允许加压或抽真空加快流速,只能让其自然洗脱;④浓缩:合并②和③步骤收集的流出液于65℃水浴中旋转

蒸发至干,用乙腈-四氢呋喃(90:10,V/V)混合液定容至1.0 ml,过0.45 μm滤膜,进高效液相色谱仪测定。

#### 1.2.3 仪器条件

色谱柱:Ultimate<sup>®</sup> XB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(88:12,V/V);流速1.0 ml/min,进样量10 μl,柱温30℃,荧光检测器激发波长384 nm,发射波长406 nm。

#### 1.2.4 不同含水量的中性氧化铝对苯并(a)芘回收率试验

准确称取混匀后同一空白食用油样品12份,每份0.3 g,分为4组,各组均分别加入0.09 ml浓度为100 ng/ml苯并(a)芘标准溶液。使用不同含水量的中性氧化铝固相萃取柱(22 g/60 ml)按1.2.1和1.2.2样品溶液制备方法制备后,采用1.2.3仪器条件进行测定,计算回收率及回收率的相对标准偏差(RSD)。

#### 1.2.5 定性定量方法

采用标准物质的保留时间对样品峰进行准确定性,并利用外标法以峰面积计算定量,将100 ng/ml的苯并(a)芘标准溶液用乙腈-四氢呋喃(90:10,V/V)混合液逐级稀释成浓度为0.5、2.0、9.0、50.0、80.0和100.0 ng/ml的标准系列溶液,在1.2.3仪器条件下进行测定,每个浓度的标准溶液测定3次,取平均值。以质量浓度(ng/ml)为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 中性氧化铝含水量对油脂去除效果和苯并(a)芘回收率的影响

国标GB/T 22509—2008规定用于油脂净化前处理的中性氧化铝为IV活度,其填料的含水量为10%,不同含水量的中性氧化铝活度值如表1所示。然而,针对某些高油脂含量的食用油,使用国标前处理方法去除油脂的效果仍然不够理想。一般来说,中性氧化铝的活度对油脂的吸附能力影响很大,这是因为中性氧化铝表面铝羟基能够通过氢键作用与油脂中饱和或不饱和脂肪酸的羰基形成氢键、偶极-偶极等作用<sup>[9]</sup>,使得油脂杂质能够较好的在填料上被吸附。本研究考察了不同活度的中性氧化铝对油脂吸附效果以及苯并(a)芘的回收率效果。由图1可知,当中性氧化铝经过450℃高温活化后完全不加水调节活度直接用于油脂前处理,虽然对油脂的吸附效果极为理想(图1-A表明基本上没有油脂杂质峰出现),但是造成苯并(a)芘的回收率极为不理想,仅为1.3%(见表2)。这说明完全不

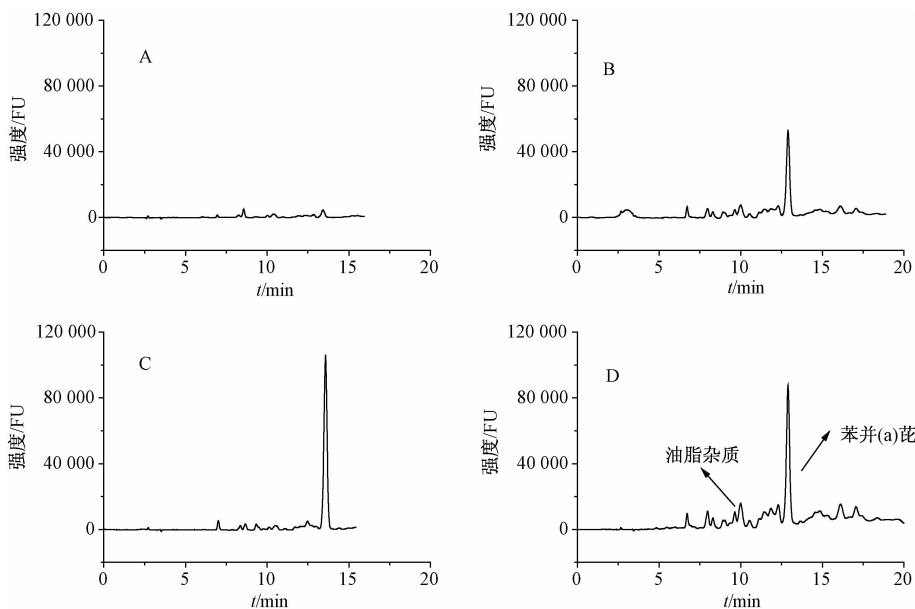
加水调节中性氧化铝的活度会导致填料对油脂成分和目标物苯并(a)芘的保留能力均太强,原因是水对于正相的中性氧化铝是强洗脱溶剂,由于填料不含有水分,导致杂质油脂和目标物苯并(a)芘在小柱上均有较好的保留,从而造成苯并(a)芘回收率低。随着中性氧化铝的含水量增加,在油脂吸附效果较好的前提下,目标物苯并(a)芘的回收率逐渐升高;但当其含水量超过6%,虽然苯并(a)芘的回收率仍然可以达到80%,但是填料对油脂的吸附能力变差,经过SPE处理后的样品明显有残余的油脂,进样后所得的色谱图也明显有较多的杂质峰(见图1-D),这是因为中性

氧化铝含水量过高而导致油脂不能在填料上被有效的吸附,随洗脱剂正己烷一起流出小柱,从而对苯并(a)芘的检测造成干扰。

表1 不同含水量中性氧化铝活度表

Table 1 Activity of neutral alumina packing with different water content

中性氧化铝含水量/%	Brochmann 活度等级
0	I
3	II
6	III
10	IV



注: A: 中性氧化铝含水量为0%; B: 中性氧化铝含水量为4%; C: 中性氧化铝含水量为6%; D: 中性氧化铝含水量为10%

图1 不同含水量的中性氧化铝前处理加标食用油样品色谱图

Figure 1 Chromatograms of spiked cooking oil sample treated with the neutral alumina packing of different water content

## 2.2 固相萃取前处理条件对油脂去除效果和苯并(a)芘回收率的影响

由于食用油中含有大量的饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸,如果前处理净化不完全,进仪器分析时会造成很大的干扰。本文2.1中虽然对中性氧化铝的活度进行了优化,得到了理想的效果。但是,如果其他的SPE前处理条件没有较好的控制也会导致试验结果不够理想。试验过程中还发现,如果食用油样品本身含有微量水分和SPE过程中用作活化、洗脱的正己烷不进行较好的除水,会造成油脂无法较好地柱内被吸附,会随目标物苯并(a)芘一起流出固相萃取柱,图2左图为油脂未完全去除的洗脱液,右图为油脂完全去除的洗脱液。因此,在试验过程中需确保食用油样品中不含水分,最好采用色谱级的正己烷,这些虽然只是前处理净化细节,但是如果不注意的话就会导致整个前处理效果不理想。

表2 不同含水量的中性氧化铝对苯并(a)芘加标回收率的影响(n=3)

Table 2 Recoveries of B(a)P the neutral alumina packing with different water

中性氧化铝的含水量/%	加标含量/(ng/g)	平均回收率/%	RSD/%
0	30.0	1.3	2.4
4	30.0	40.3	2.7
6	30.0	93.2	2.6
10	30.0	85.3	2.9

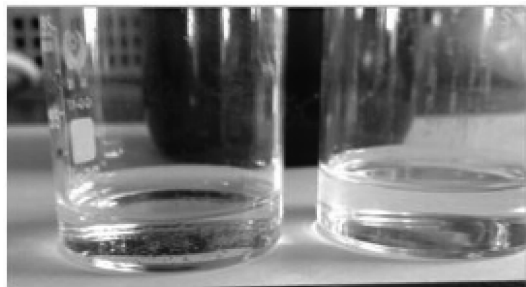
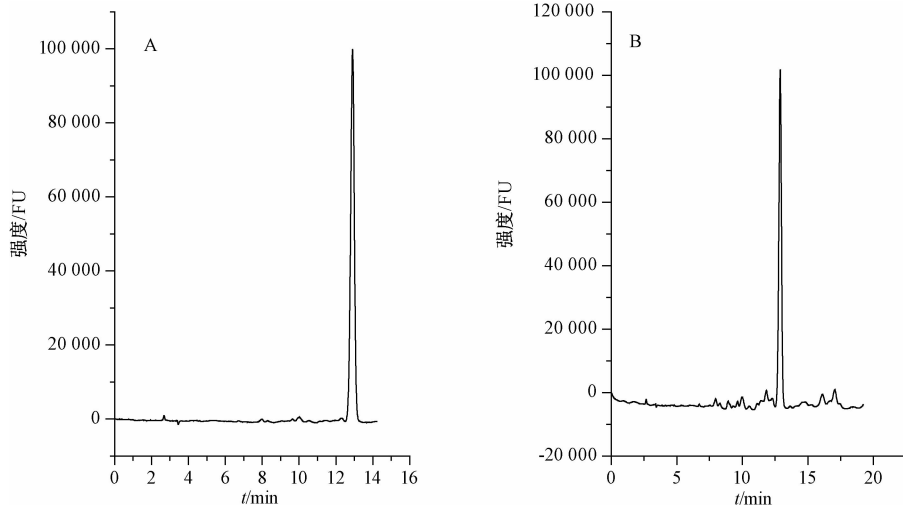


图2 SPE净化效果对比实验图

Figure 2 Comparison of experimental results of SPE purification effects

### 2.3 标准曲线线性范围

将逐级稀释的标准溶液分别进样 10  $\mu\text{l}$ , 测定结果经线性回归, 试验结果表明, 苯并(a)芘含量与峰面积的线性范围为 0.5 ~ 100 ng/ml; 线性曲



注: A为苯并(a)芘标准溶液色谱图; B为食用油样品加标溶液色谱图

图3 苯并(a)芘标准溶液(9.0 ng/ml)和食用油样品加标溶液(30 ng/g)色谱图

Figure 3 B(a)P standard HPLC chromatogram and add cooking oil sample recovery spectra

### 2.4 方法检测限、回收率和精密度

进空白食用油样品, 以基线 3 倍噪音 ( $S/N = 3$ ) 在标准工作曲线查得结果计算, 食用油中苯并(a)芘的检出限 0.5 ng/g。

称取空白食用油样品 15 份, 每份 0.3 g (精确到 0.001 g), 分别向 5 份空白食用油中添加浓度为 100 ng/ml 的苯并(a)芘标准溶液 0.015、0.03 和 0.09 ml, 按 1.2.1 和 1.2.2 样品溶液制备方法制备后进行测定, 并分别计算回收率。由表 3 可知, 加标回收率在 91.2% ~ 101.0% 之间, 相对标准偏差在 2.2% ~ 2.9% 之间, 满足试验要求。

表3 苯并(a)芘回收率测定结果

Table 3 Recovery results of the B(a)P

样品编号	原始含量 /(ng/g)	加标含量 /(ng/g)	检测量 /(ng/g)	回收率 /%	相对标准 偏差/%
食用油 1	—	5.0	4.3	86.3	2.5
食用油 2	—	5.0	4.4	88.4	
食用油 3	—	5.0	4.4	87.2	
食用油 4	—	5.0	4.5	90.4	
食用油 5	—	5.0	4.2	84.7	
食用油 6	—	10.0	9.1	91.2	2.2
食用油 7	—	10.0	9.3	93.4	
食用油 8	—	10.0	9.5	95.4	
食用油 9	—	10.0	9.2	92.5	
食用油 10	—	10.0	9.6	96.1	
食用油 11	—	30.0	28.6	95.3	2.9
食用油 12	—	30.0	30.3	101.0	
食用油 13	—	30.0	28.4	94.6	
食用油 14	—	30.0	28.2	94.0	
食用油 15	—	30.0	31.1	96.4	

注: 一为空白食用油样品中不含 B(a)P

线方程 ( $y$  为峰面积,  $x$  为进样浓度, ng/ml) 为  $y = 162741.6x + 3781$ , 相关系数为 0.999 7, 图 3 为苯并(a)芘标准溶液和实际样品中加标溶液测定色谱图。

### 3 小结

本文建立了检测食用油中苯并(a)芘残留的固相萃取-高效液相色谱-荧光检测器测定方法。试验结果表明, 其回收率为 91.2% ~ 101.0%, 最低检出量为 0.5 ng/g, 符合国标中对食用油中苯并(a)芘的检测要求。本研究最大的创新点在于开发了一种专用于食用油中苯并(a)芘前处理净化的专用填料, 其中性氧化铝填料的含水量为 6%, 用作食用油专用净化填料能够有效排除杂峰对苯并(a)芘目标峰的干扰, 获得色谱图背景干净、峰型好的色谱峰。本试验所建立的方法样品预处理简单、分析时间短、明显提高了检测效率、其准确性和精密度好, 适用于食用油样品中苯并(a)芘的准确测定。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 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.
- [3] 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.
- [4] 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, 29(5): 221-222.
- [5] 胡奇杰, 沈黎炜, 戚民, 等. 高效液相色谱法测定肉制品中的苯并芘[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(6): 146-149.

- [6] 李凤梅,张玉娜,赵宏坤.液相色谱法测定油性食品中苯并(a)芘的方法改进[J].粮油食品科技,2013,21(2):42-45.
- [7] 刘宏程,黎其万,刘家富.基质固相分散高效液相色谱法测定植物油中的痕量苯并(a)芘[J].色谱,2006,24(4):415.
- [8] 史海良.固相萃取-高效液相色谱-荧光检测方便面中的苯并(a)芘[J].食品工业科技,2013,34(8):65-67.
- [9] 郭瑾,马军,刘嵩,等.天然有机物在氧化铝表面的吸附机理研究[J].环境科学学报,2006,26(1):111-117.

## 实验技术与方法

# RapidChek SELECT 检测食品中沙门菌方法的评价

闫韶飞,王伟,胡豫杰,徐进,赫英英,李凤琴

(国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021)

**摘要:**目的 评价 RapidChek SELECT 方法对食品中沙门菌的检测效果并验证。方法 用添加并回收沙门菌标准菌株方法验证 RapidChek SELECT 的检测限,添加非沙门菌标准菌株方法测定其特异性,以国标法为参比,通过检测实际样品,对 RapidChek SELECT 方法进行验证。结果 ①RapidChek SELECT 沙门菌检测试纸条的检测限为 1 cfu/25 g(或 1 cfu/ml);②与 10 种非沙门菌无交叉反应特异性;③直接检测食品中沙门菌的最低浓度为  $10^6$  cfu/ml;④对实际样品中沙门菌的检测结果显示,RapidChek SELECT 方法和国标方法阳性率分别为 87.5% (35/40) 和 85% (34/40),两种方法最终检测结果的符合率为 97.5% (39/40),RapidChek SELECT 方法等同于国标方法。结论 与国标方法相比,RapidChek SELECT 沙门菌检测试剂盒灵敏度高、特异性强、操作简便,有效减少非沙门菌的干扰、省时,适用于食品中沙门菌的快速检测。

**关键词:** RapidChek SELECT; 沙门菌; 检测方法; 食品; 食源性致病菌

中图分类号: R155; Q93-3 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0144-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.011

## Evaluation of RapidChek SELECT method for detection of *Salmonella* in foods

YAN Shao-fei, WANG Wei, HU Yu-jie, HE Ying-ying, LI Feng-qin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

**Abstract: Objective** To evaluate and validate the performance of the RapidChek SELECT method for rapid detection of *Salmonella* in foods. **Methods** The limit of detection (LOD) and the specificity of RapidChek SELECT method were assessed by spiking *Salmonella* and non-*Salmonella* reference cultures into different food matrix, respectively. Meanwhile, RapidChek SELECT method was validated via examining *Salmonella* contamination in food samples in comparison with the China national standard method. **Results** The limit of detection of RapidChek SELECT method were 1 cfu/25 g or 1 cfu/ml. The RapidChek SELECT method showed good specificity and no cross-reactivity in determination of 10 kinds of non-*Salmonella* reference strains. The lowest cell density of *Salmonella* in food samples for direct detection by RapidChek strip was  $10^6$  cfu/ml. Of the 40 food samples examined, 87.5% (35/40) and 85% (34/40) were positive for *Salmonella* examined by RapidChek SELECT method and China national standard method, respectively. A good coincidence in the results obtained by both methods was observed (97.5%, 39/40). RapidChek SELECT method exhibits a slightly better proficiency than China national standard method. **Conclusion** The RapidChek SELECT is an effective alternative analytical method with characteristics of high sensitivity, specificity, easy-to-use, lower interference from non-*Salmonella*, time-saving, and suitable for rapid detection of *Salmonella* in foods.

**Key words:** RapidChek SELEC; *Salmonella*; detection; foods; foodborne pathogens

收稿日期: 2015-01-06

基金项目: 国家食品安全风险评估中心青年科研基金项目(2014009)

作者简介: 闫韶飞 男 助理研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: yanshaofei@cfsa.net.cn

通讯作者: 李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn