

凝胶渗透色谱-高效液相色谱法同时测定食用油中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP

朱晓玲, 刘 杰, 范志勇, 曹 晖, 彭青枝
(湖北省食品质量与安全监督检验研究院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 建立同时测定食用油中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP的凝胶渗透色谱-高效液相色谱分析方法。食用油样品经预处理后采用GPC进行净化, C₁₈反相色谱柱(250mm×4.6mm, 5μm)进行分离, 乙腈和水为流动相, 梯度洗脱, 并采用紫外-荧光检测器串联的方式进行检测。在最佳测定条件下, 6种目标化合物在相应的线性范围内其线性相关系数均不小于0.9980, 方法的回收率为82.0%~103.7%, 相对标准偏差为3.2%~7.5%(n=6)。该方法简便、准确, 可用于食用油样品中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP的同时测定。

关键词: 凝胶渗透色谱; 反相高效液相色谱; 食用油

Determination of BaP, BHA, BHT, TBHQ, DBP and DEHP in Edible Oil by Gel Permeation Chromatography and High Performance Liquid Chromatography

ZHU Xiao-ling, LIU Jie, FAN Zhi-yong, CAO Hui, PENG Qing-zhi
(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430070, China)

Abstract: A method was developed for the simultaneous determination of BaP, BHA, BHT, TBHQ, DBP and DEHP in edible oil by gel permeation chromatography and high performance liquid chromatography (GPC-HPLC). Samples were purified by GPC after pretreatment, then separated on a reversed-phase C₁₈ column with acetonitrile and water as the mobile phase in a gradient elution mode. The target compounds were detected by UV-tandem fluorescence detector. Under the preferred test conditions, the linear ranges of the method were 0.0002–0.2 mg/L for BaP, 1–500 mg/L for BHA, BHT and TBHQ, and 0.1–100 mg/L for DBP and DEHP, with correlation coefficients of more than 0.9980. The spiked recovery rates were 82.0%–103.7% with relative standard deviations (RSD, n = 6) of 3.2%–7.5%. The developed method is simple and accurate, and can be used for the simultaneous determination of BaP, BHA, BHT, TBHQ, DBP and DEHP in edible oil samples.

Key words: gel permeation chromatography; reversed-phase high performance liquid chromatography; edible oil

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)24-0258-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201324054

食用油主要是指可食用的动物或植物来源的油脂, 是人们日常生活的必需消费品, 同时也是食品、饲料、轻化工和生物能源产业的重要基础原料。我国是食用油消费大国, 消费量已位居世界第一, 食用油脂的质量安全与我国居民的身体健康息息相关。目前, 我国的食用油安全已被列为国家战略安全之一。食用油的质量安全问题主要来自于原料加工、贮藏和使用等各个环节。为实现食品质量安全问题的早发现、早研判、早预警、早处置, 对可能存在质量安全隐患的产品进行跟踪监测, 制订风险监测计划尤有必要。2011年, 国家在食品生产加工环节风险监测检验方案中对食用油的检验项目主要有丁基羟基茴香醚(BHA)、二丁基羟基甲苯(BHT)、特丁

基对苯二酚(TBHQ)和苯并(a)芘(BaP)等; 2013年又增加了对邻苯二甲酸酯类物质的监测。

BaP是一种5环芳烃类化合物, 可诱发皮肤、肺、消化道和膀胱等的癌症病变^[1], 是一种高活性致癌剂, 油脂加工过程中, 一些加工厂商通常将原料进行炒制以提高出油率, 但因缺乏恒温装置, 加工过程中易出现局部温度过高现象, 从而导致有机物热解、聚合和不完全燃烧产生BaP; BHA、BHT和TBHQ是我国允许使用的3种食品抗氧化剂, 用于食用油脂中可阻断油脂的自动氧化链式反应从而达到防止油脂氧化变质的目的, 但若人体过量摄入, 会对人体的肝、脾、肺等器官产生不利影响^[2]; 邻苯二甲酸二丁酯(DBP)和邻苯二甲酸二辛酯(DEHP)是目前

收稿日期: 2013-03-29

作者简介: 朱晓玲(1987—), 女, 助理工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测与色谱分析。E-mail: chuandian1987@yahoo.com.cn

塑料加工中使用最广泛的两种邻苯二甲酸酯类物质,近期的塑化剂风波使人们对塑料桶装食用油的质量安全问题产生质疑,人体长期摄入塑化剂会损坏人体的生殖系统、免疫系统及消化系统,大量食用可能致癌^[3],台湾地区已将其列为第4类毒剂化学物质,不得在食品中添加。

目前,国内外关于食用油中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP的检测方法主要有荧光分光光度法^[4]、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法^[5-8]、气相色谱法^[9-10]、液相色谱-质谱联用法^[11-12]、气相色谱-质谱联用法^[13-15]等。样品的前处理方法主要有基质固体分散萃取法^[16]、固相萃取法^[14]、超临界萃取法等。我国国家风险监测对上述6种物质(3类物质)的检测方法程序复杂,需要3次分别净化处理,3次分别测定,较为耗时;目前国内外文献中,对食用油中单一类别化合物成分进行GPC-HPLC测定的研究方法报道较多,但对3类化合物进行同时检测的方法尚未见报道。

本实验拟采用凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)技术对样品进行一次净化,并结合HPLC技术对样品中的BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP进行同时测定,以建立一种简单、快速、准确的食用油中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP同时测定的分析方法,实现样品前处理的自动化,节省检测成本和缩短检测时间,为食用油的安全监管提供便利。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

精炼食用油 市售。

苯并(a)芘(BaP, 纯度99.6%)、丁基羟基茴香醚(BHA, 纯度97.0%)、二丁基羟基甲苯(BHT, 纯度99.5%)、特丁基对苯二酚(TBHQ, 纯度99.0%)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP, 纯度99.5%)、邻苯二甲酸二辛酯(DEHP, 纯度99.5%) 美国Sigma公司; 乙腈(色谱纯) 美国天地公司; 环己烷和乙酸乙酯(使用前需重蒸馏, 分析纯) 天津永大化学试剂有限公司。

e2695型高效液相色谱仪(配2998二极管阵列检测器、2475荧光检测器和Empower色谱工作站) 美国Waters公司; GPC凝胶渗透色谱仪及AccuPrep MPSTM GPC快速净化柱 美国J2 Scientific公司; 旋转蒸发器瑞士Büchi公司; 分析天平 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 0.45μm有机相滤膜 德国Membrana公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Symmetry C₁₈柱(4.6mm × 250mm, 5μm); 流动相: 乙腈(A)和水(B), 梯度洗脱程序见表1;

柱温: 35 ; 进样量: 10μL; 检测器: 二极管阵列与荧光检测器串联; 紫外检测波长230nm(检测BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP), 荧光检测器激发波长384nm, 发射波长406nm(检测BaP)。

表1 HPLC梯度洗脱程序
Table 1 Gradient program conditions for HPLC

时间/min	流速/(mL/min)	流动相体积分数配比/%	
		A	B
0.0	0.8	50	50
7.0	0.8	50	50
9.0	0.8	100	0
11.5	1.0	100	0
20.0	1.0	100	0
21.0	0.8	50	50

1.2.2 标准溶液的配制

分别准确称取BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP标准品各50mg(精确至0.1mg)于50mL容量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 分别配成质量浓度为1.0mg/mL的标准储备液, 于4 保存, 备用。各取适量的单一标准储备液混合, 用乙腈稀释至100mL容量瓶中配成混合标准溶液, 得到混标溶液中各物质的质量浓度: BaP为0.20μg/mL, BHA、BHT、TBHQ为0.50mg/mL, DBP、DEHP为0.10mg/mL。

1.2.3 样品提取

称取食用油样品(若样品为凝固状态, 则首先需在60 水浴中加热溶解混匀)0.4g(精确到0.001g)于10mL比色管中, 加入乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V)使样品溶解并定容至刻度, 振荡2min, 将溶液过0.45μm有机相滤膜后转移至GPC样品瓶中, 待净化。

1.2.4 样品净化

将1.2.3节中的待净化液进GPC进行净化, 采用AccuPrep MPSTM GPC快速净化柱, 以乙酸乙酯-环己烷(1:1, V/V)为流动相进行洗脱, 流速5.0mL/min, 进样量5mL, 紫外检测波长254nm, 流出液收集时间7.5~22.0min, 并采用GPC仪器中的自动浓缩功能蒸干模式进行浓缩, 收集的洗脱液经浓缩至干后用乙腈自动定容至1.5mL并转移至HPLC进样瓶中, 供HPLC分析。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的选择

2.1.1 样品净化方法的选择

对于油脂含量较高的样品, 采用常规的液-液萃取或固相萃取等方法不能将干扰成分彻底除去。李燕艳等^[17]通过比较实验发现, ISO 15302:2007《动物和植物的脂肪和油中苯并芘含量的测定: 反相高效液相色谱法》和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》中采用柱层析法对食用油样品进行净化时精密度和重复性难以控制；GB/T 5009.27—2003《食品中苯并(a)芘的测定》中使用液-液萃取法进行样品前处理，溶剂用量大，分离步骤复杂；Vazquez^[18]以及李春篱^[19]等采用固相萃取法对食用油样品进行净化，发现此法对部分油品(如花生油、茶油、芝麻油等)净化效果良好，但在分离净化某些油品(如椰子油)时出现净化不干净的现象。而GPC技术是基于空间排阻的原理将不同体积大小的物质进行分离，其在富含脂肪、色素等大分子的样品分离净化方面具有显著的优势^[20-23]。因此，选择GPC法对样品进行净化。

2.1.2 GPC净化条件的选择

GPC净化的主要目的是将目标化合物从食用油样品中分离出来，避免干扰成分对测定结果的影响。因此，在GPC的工作参数中流出液的收集时间段选择尤为重要。本实验分别将空白油样以及BaP标液、3种抗氧化剂(BHA、BHT、TBHQ)混合标准溶液、2种邻苯二甲酸酯类物质(DBP、DEHP)混标溶液进行GPC净化实验，采用系统自带的紫外检测器进行检测，以观察凝胶色谱柱对6种目标组分与样品基质的分离净化效果。在254nm波长条件下检测得到的各目标组分与食用油样品基质的GPC净化色谱图见图1。

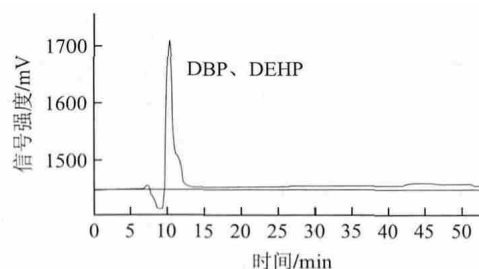
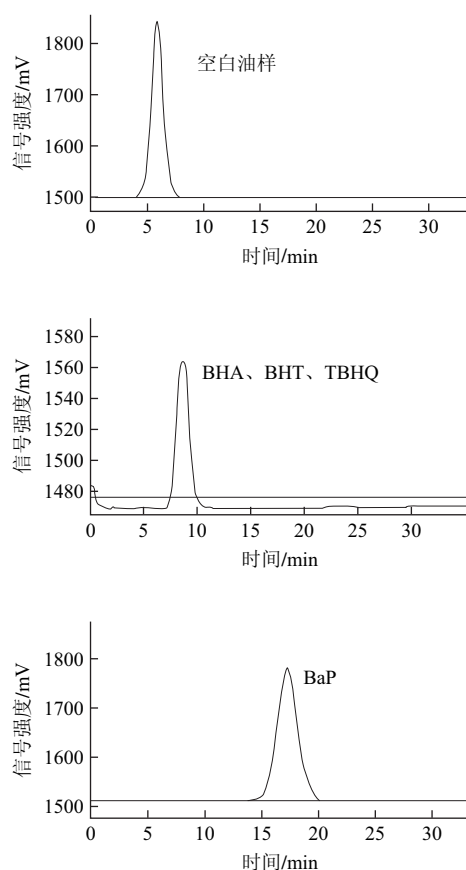


图1 GPC净化色谱图

Fig.1 GPC chromatograms

由图1可见，空白食用油样品基质成分在7.5min之前全部流出GPC净化柱，食用油样品基质的主要成分为脂肪酸甘油酯，相对分子质量在800以上，而GPC净化色谱柱的填料主要由化学惰性的中空小球组成，样品中小分子化合物会从填料的孔中穿过，大分子则从填料周围的空间穿过，以造成小分子与大分子之间的行程差距从而达到分离的目的，因此食用油样品中的大分子干扰成分最先从GPC凝胶柱填料的粒间流出。从图1还可见，目标化合物BaP的流出时间为15.0~20.0min，3种抗氧化剂(BHA、BHT、TBHQ)的流出时间为7.5~10.0min，两种邻苯二甲酸酯类物质(DBP、DEHP)的流出时间为10.0~12.5min，因此最终确定GPC流出液的收集时间段为7.5~22.0min，以有效除去大分子基质的干扰，避免油脂分子对HPLC色谱柱的损伤。

2.1.3 称样量的选择

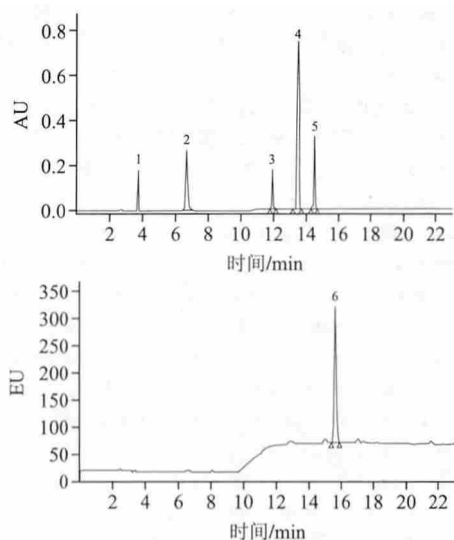
GPC净化色谱柱的负荷量是有限的，浓度过高易发生过载现象，导致净化不完全并会造成一定的残留。本实验所采用的GPC净化色谱柱为AccuPrep MPSTM GPC快速柱(300mm × 10mm)，填料为25g，结果表明，当油脂样品称样量为0.7g时，GPC净化能力达到饱和，称样量大于0.7g时，目标化合物回收率降低，另外对于一些颜色较深的食用油样品(如小磨香油)，称样量为0.5g时GPC净化能力即达到饱和，油脂样品的合适称样量为0.3~0.5g，以满足低浓度的检出，同时避免高浓度时强极性物质残留于柱填料中造成柱压升高和着色等现象。

2.2 色谱条件的选择

2.2.1 流动相的选择

当采用流动相乙腈-水(80:20, V/V)进行洗脱时，BaP出峰时间为18.6min，DBP出峰时间为12.3min，3种抗氧化剂在10min内出峰完全，但TBHQ的出峰时间过早，为1.4min，表明其在色谱柱中保留时间较短，在进行样品分析时易受到杂质成分的干扰，另外DEHP在30min的分析时间内未出峰，即30min内未被洗脱下来；当采用100%乙腈为流动相进行洗脱时，DEHP可在7.8min出峰；当采用流动相乙腈-水(50:50, V/V)进行洗脱时，TBHQ出峰时间为3.7min，可较好地与样品杂质成分分离。因此，在上述等度洗脱实验的基础上，调整流动相比例，

最后得出表1中的梯度洗脱程序,在该洗脱条件下,6种组分可实现基线分离,其色谱图见图2。



1.TBHQ; 2.BHA; 3.BHT; 4.DBP; 5.DEHP; 6.BaP。

图2 6种目标化合物混合标准溶液的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of mixed standard solution with 6 target compounds

2.2.2 HPLC流速的选择

固定流动相A与B的梯度洗脱比例,考察在恒流速和变流速两种实验条件下对于分析结果的影响,发现当以恒流速0.8mL/min进行实验时,由于乙腈的黏度较低,当流动相比由乙腈-水(50:50, V/V)转变为乙腈100%时,仪器系统压力波动较大,由1700psi下降至600psi,导致图谱基线波动较大,而采用表1中的变流速进行实验时,基线波动相对较小,因此选择变流速梯度洗脱进行实验。

2.3 标准曲线、检出限及线性范围

表2 BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP的线性范围、回归方程、相关系数与检出限

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients and detection limits for BaP, BHA, BHT, TBHQ, DBP and DEHP

化合物	线性范围/(mg/L)	回归方程	相关系数	检出限/(mg/kg)
BaP	0.0002~0.2	$y=1.27 \times 10^5 x - 5.06 \times 10^4$	0.9999	1×10^{-6}
BHA	1~500	$y=6.11 \times 10^5 x - 5.77 \times 10^4$	0.9982	0.2
BHT	1~500	$y=7.01 \times 10^5 x + 3.54 \times 10^4$	0.9992	0.2
TBHQ	1~500	$y=-9.23 \times 10^5 x + 2.83 \times 10^4$	0.9987	0.2
DBP	0.1~100	$y=1.58 \times 10^5 x + 2.91 \times 10^4$	0.9998	0.01
DEHP	0.1~100	$y=1.33 \times 10^5 x + 3.23 \times 10^4$	0.9980	0.01

将混合标准溶液分别稀释5、10、25、50倍,配成一系列质量浓度,采用1.2.1节色谱条件进样10 μ L进行分析,以标样质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性回归方程,同时进行样品添加实验,以信噪比 $R_{SN}=3$ 确定各组分在食用油样品中的检出限,结果见表2。6种目标化合物在相应的线性范围内其线性相关系数均不小于0.9980。

2.4 回收率和精密度

在空白样品中加标进行回收率和精密度测定。准确称取食用油样品0.4g,分别添加高、中、低3个水平的混合标准溶液,按1.2.3、1.2.4节样品处理方法平行处理并按1.2.1节色谱条件进行检测,每一加标水平平行测定6次,计算平均回收率。得到6种目标组分(BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP)的加标回收率和精密度结果见表3。结果表明,方法的回收率为82.0%~103.7%,相对标准偏差(RSD)为3.2%~7.5%,在不同加标水平下,6种目标化合物回收率稳定,精密度良好,可以满足食用油中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP同时测定的分析要求。

表3 BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP的回收率(n=6)
Table 3 Recovery rates of BaP, BHA, BHT, TBHQ, DBP and DEHP from spiked samples (n = 6)

化合物	添加量/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
BaP	0.01	96.4	3.8
	0.02	98.2	4.0
	0.04	95.0	3.7
BHA	20	88.7	5.7
	50	94.1	4.5
	100	95.9	3.4
BHT	20	93.8	4.4
	50	82.0	5.9
	100	96.4	6.0
TBHQ	20	87.8	4.1
	50	93.9	3.6
	100	95.1	4.3
DBP	2	94.3	5.0
	10	101.6	6.5
	50	93.7	4.7
DEHP	2	94.3	3.2
	10	85.6	7.5
	50	103.7	6.2

2.5 样品分析

应用所建立的方法对购自湖北超市的30批次食用油样品(均为精炼油)进行检测,结果发现在此30批次样品中检出1批次食用油BaP含量为23 μ g/kg,超过国家规定的标准限量值(10 μ g/kg),为不合格产品。检出含有TBHQ的样品1批次,含量为0.011g/kg;在30批次食用油样品中未检出BHA和BHT。另外,还检出含有DBP的样品2批次,含量分别为0.001g/kg和0.013g/kg;检出含DEHP的样品3批次,含量在0.004~0.016g/kg之间。

3 结论

建立了GPC净化, HPLC-紫外-荧光检测器串联测定食用油中BaP、3种抗氧化剂(BHA、BHT、TBHQ)和两种

邻苯二甲酸酯类物质(DBP、DEHP)的方法,通过对GPC净化条件以及HPLC分离条件的优化,使得食用油样品仅需进行一次净化处理,即可采用HPLC对6种目标化合物进行同时测定,在上述实验条件下6种目标化合物回收率稳定,精密度良好,所建立的方法可满足食用油中BaP、BHA、BHT、TBHQ、DBP、DEHP同时测定的分析要求。该法简单、快速、实现了样品前处理的自动化,大大节省了检测成本和检测时间,可为食用油的安全监管提供便利。

参考文献:

- [1] 蒲云霞, 苏军, 徐晓枫, 等. 固相萃取-反相高效液相色谱法检测植物油中的苯并(a)芘[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(5): 990-992.
- [2] 吴小梅, 袁联群, 孙迎新. 气相色谱法测定植物油中的抗氧化剂BHA BHT与TBHQ及不确定度评定[J]. 农产品加工: 学刊, 2012(11): 154-156.
- [3] 吴惠勤, 朱志鑫, 黄晓兰, 等. 不同类别食品中21种邻苯二甲酸酯的气相色谱-质谱测定及其分布情况研究[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1079-1087.
- [4] SANTANA J J, FERRERA Z S, AFONSO A, et al. Simultaneous synchronous fluorimetric determination of benzo(a)pyrene and perylene in micellar media[J]. Analytica Chimica Acta, 1991, 255(1): 107-111.
- [5] 蔡发, 段小娟, 牟志春, 等. 高效液相色谱法同时测定食品中的12种抗氧化剂[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 207-211.
- [6] 杨占南, 彭全材, 罗世琼, 等. 贵阳市油炸食品中苯并芘的测定及其安全评价[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 449-452.
- [7] 佟晓波, 李莹, 矫筱曼, 等. HPLC法测定化妆品中十六种邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 香料香精化妆品, 2012(3): 33-38.
- [8] 王睿, 雷鸣, 欧阳华学, 等. 凝胶渗透-液相色谱法检测食用油中3种邻苯二甲酸酯类物质[J]. 食品工业, 2007 (3): 58-60.
- [9] 林太凤, 张淑芬, 王惠琴, 等. PSE-GC法同时测定饼干中两种抗氧化剂[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(8): 144-146.
- [10] ZHOU Xin, SHAO Xiao, SHU Jianjun, et al. Thermally stable ionic liquid-based sol-gel coating for ultrasonic extraction-solid-phase microextraction-gas chromatography determination of phthalate esters in agricultural plastic films[J]. Talanta, 2012, 89(30): 129-135.
- [11] 李秀勇, 牟峻, 刘惠涛, 等. 超高效液相色谱-质谱法测定油脂中的10种抗氧化剂[J]. 分析化学, 2008, 36(3): 369-372.
- [12] 凌云, 储晓刚, 张峰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定调味料中的17种防腐剂和抗氧化剂[J]. 色谱, 2011, 29(8): 723-730.
- [13] 佟晓芳. 乳制品中邻苯二甲酸酯类化合物残留量检测方法[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(1): 59-62.
- [14] ELKE F, WILHELM P. Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS[J]. Water Research, 2002, 36(9): 2319-2327.
- [15] MACIEJ J B, SAMIR A E, ZEYAD E, et al. Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography-mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1026(2): 1-7.
- [16] WU Xiaoli, HONG Huijie, LIU Xiaotong, et al. Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water[J]. Science of The Total Environment, 2013, 444(1): 224-230.
- [17] 李燕艳, 杨虹, 魏婷婷, 等. RP-HPLC法测定食用油中苯并(a)芘的含量[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12): 103-105.
- [18] VAZQUEZ T S, GARCIA F. Enrichment of benzo(a)pyrene in vegetable oils and determination by HPLC-FLD[J]. Talanta, 2000, 51: 1069-1076.
- [19] 李春篱, 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): 39-41.
- [20] 应剑波, 谢伟宏, 程建波, 等. 微波萃取-GPC净化-GC/MS法检验血中氨基甲酸酯和沙蚕毒素类农药[J]. 质谱学报, 2009, 30(1): 47-50.
- [21] 赵子刚, 吕建华, 王建. 凝胶渗透色谱技术在农药残留检测中的应用[J]. 粮油食品科技, 2010, 18(2): 47-50.
- [22] 李仁伟, 程明川, 李想, 等. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱法检测食用油中邻苯二甲酸酯类的含量[J]. 食品工业科技, 2011(12): 484-488.
- [23] 张春雨, 王辉, 张晓辉, 等. 凝胶渗透色谱净化-高效液相色谱法测定油脂食品中的邻苯二甲酸酯类增塑剂[J]. 色谱, 2011, 29(12): 1236-1239.