

中华人民共和国国家标准

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

Animal and vegetable fats and oils—Determination of benzo(*a*)pyrene—
Reverse-phase high performance liquid chromatography method

(ISO 15302:2007, MOD)

2008-11-04 发布

2009-01-20 实施



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

发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
动植物油脂 苯并(a)芘的测定
反相高效液相色谱法
GB/T 22509—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2009年4月第一版 2009年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-36560 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

本标准修改采用 ISO 15302:2007《动植物油脂 苯并(a)芘的测定 反相高效液相色谱法》(英文版)。

本标准与 ISO 15302:2007 相比主要技术性差异为:

- 删除了名词术语;
- 对仪器设备作了适当修改;
- 增加了氧化铝活度的测定方法;
- 将洗脱试剂石油醚(40 °C~60 °C)或正己烷更改为石油醚(30 °C~60 °C)或正己烷;
- 将待测液定容体积 250 μL 更改为 100 μL , 将进样体积 50 μL 更改为 10 μL ;
- 将内标法定量计算更改为外标法定量计算。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 均为资料性附录。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:大连市产品质量监督检验所、国家粮食质量监督检验中心、大连标准检测技术研究中心。

本标准主要起草人:董广彬、郑顺利、王春燕、李鹏、潘炜、姜俊、李海燕、顾鑫荣、关成、毛希琴、勇艳华、刘志璋、张晓凡。

动植物油脂 苯并(a)芘的测定

反相高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用反相高效液相色谱法测定动植物油脂中苯并(a)芘的原理、试剂和材料、仪器和设备、采样方法、试样的制备、操作步骤、测试结果的表示及精密度等内容。

本标准适用于动植物油脂。

本标准方法的最低检出限：0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本标准的测量范围：0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法(GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD)

GB/T 15687 油脂试样制备(GB/T 15687—1995, eqv ISO 661:1989)

3 原理

样品经溶剂溶解，通过氧化铝柱吸附，用洗脱试剂洗脱苯并(a)芘，用反相高效液相色谱分离，荧光检测器检测，根据色谱峰的保留时间定性，外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊要求外，所用试剂为分析纯试剂。当使用推荐试剂以外的分析纯试剂时，应全部进行空白试验并报告空白分析的结果。

4.1 水：符合 GB/T 6682 规定的一级水要求。

4.2 石油醚(沸程 30 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$)或正己烷：每升加 4 g 氢氧化钾颗粒重蒸。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 四氢呋喃：色谱纯。

4.5 乙腈四氢呋喃混合溶液：90 mL 乙腈(4.3)和 10 mL 四氢呋喃(4.4)的混和溶液。

4.6 甲苯：色谱纯。

4.7 无水硫酸钠。

4.8 层析用中性氧化铝(100 目~200 目)：Brockmann 活度Ⅳ级(参见附录 A)，由活度为Ⅰ级的中性氧化铝减活制备而成。将 90 g 经 450 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 12 h 的氧化铝放入密闭容器中降至室温，加入 10 mL 水(4.1)。剧烈摇动容器 15 min，静置平衡 24 h，室温下密闭避光保存。由于不同品牌氧化铝活性存在差异，建议对质控样品进行测试，使氧化铝活性满足苯并(a)芘的回收率要求。建议应做相应的样品回收实验验证氧化铝活性。

4.9 苯并(a)芘标准品：CAS 编号：50-32-8，纯度不低于 99.0%。

警告——苯并(a)芘是一种已知的致癌物质,测定时应特别注意安全防护。测定应在通风柜中进行并戴手套,尽量减少暴露。

4.10 苯并(a)芘标准贮备溶液:准确称取 12.5 mg 苯并(a)芘(4.9)于 25 mL 容量瓶中,用甲苯(4.6)溶解,定容。此溶液约含苯并(a)芘 0.5 mg/mL,4℃避光保存,至少 6 个月内稳定。

4.11 标准工作液:用苯并(a)芘标准贮备溶液(4.10),分别配制苯并(a)芘含量大约为 0.2 μg/mL 和 0.01 μg/mL 的两种标准溶液。

5 仪器和设备

5.1 玻璃层析柱(参见附录 B):配有烧结玻璃垫和聚四氟乙烯旋塞。

5.2 恒温水浴。

5.3 旋转蒸发器。

5.4 高效液相色谱仪:如果使用自动进样器,样品定量环应在序列进样间用乙腈冲洗。

5.5 玻璃样品瓶:约 1 mL,配有可密封的盖子。

6 扦样方法

实验室接收的样品应具有代表性,且在运输和贮存过程中样品不被破坏或改变。

本标准不规定扦样方法,推荐采用 GB/T 5524 规定的扦样方法。

7 试样的制备

按 GB/T 15687 方法制备试样。

8 操作步骤

8.1 样品的净化

用玻璃烧杯称取约 0.4 g 试样,精确到 0.001 g,用 2 mL 石油醚(4.2)溶解稀释。

向层析柱(5.1)中加入一半高度的石油醚(4.2)。快速称取 22 g 氧化铝(4.8)于小烧杯中,立即转移到层析柱(5.1)中,轻轻敲打层析柱,使氧化铝均匀沉淀。再装入一层约 30 mm 高的无水硫酸钠(4.7)。打开层析柱底部的旋塞,石油醚流出至无水硫酸钠的顶部,关闭旋塞。

在层析柱出口端放置一个 20 mL 的量筒。向层析柱中移入样品溶液,用 2 mL 石油醚(4.2)清洗层析柱内壁。向层析柱加入 80 mL 石油醚(4.2)洗脱,流速为 1 mL/min,洗脱液放满 20 mL 量筒后,弃去。换用圆底烧瓶收集其余洗脱液。

将收集的洗脱液在 65℃的水浴中旋转蒸发(5.3)至 0.5 mL~1.0 mL,转移至一个预先称量的玻璃样品瓶(5.5)中。玻璃样品瓶置于 35℃的水浴(5.2)中继续蒸发,并用氮气吹至近干(氮气流量大约为 25 mL/min)。用石油醚清洗圆底烧瓶两次,每次 1 mL,将清洗液转移至玻璃样品瓶中,继续在 35℃及氮气条件下蒸发至干。称量玻璃样品瓶的质量(精确到 0.1 mg),计算瓶内残渣质量。旋紧样品瓶盖,4℃储存备用。

8.2 测定

8.2.1 推荐的色谱条件

推荐的色谱条件如下:

- a) 保护柱: Lichrosorb RP-C₁₈, 4.6 mm×75 mm, 粒度 5 μm;
- b) 色谱柱: 多环芳烃分析柱, 4.6 mm×250 mm;
- c) 进样量: 10 μL;
- d) 流动相: 乙腈: 水为 880: 120(体积比);
- e) 流速: 1.0 mL/min;

f) 荧光检测器:发射波长:406 nm(狭缝 10 nm),激发波长:384 nm(狭缝 10 nm)。

8.2.2 标准曲线的绘制

将标准工作液(4.11)稀释为五种不同浓度的溶液,每个溶液进样量为 10 μL 时苯并(a)芘的质量为 0.004 ng、0.008 ng、0.04 ng、0.2 ng、0.4 ng。根据峰的积分面积绘制 5 点校正曲线,色谱图参见附录 C。

8.3 样品分析

8.3.1 向装有待测试样(8.1)的玻璃样品瓶中注入 100 μL 的乙腈四氢呋喃混合溶液(4.5)。小心涡旋溶解残渣,避免样品瓶盖与溶剂接触。使用标准曲线(8.2.2),对苯并(a)芘在 0.1 μg/kg~50 μg/kg 的范围内定量。苯并(a)芘含量超过 10 μg/kg 的样品可以使用乙腈四氢呋喃混合溶液(4.5)稀释或减少进样体积。

8.3.2 将 10 μL 的试样液注入液相色谱仪进行测定。保证注入到色谱柱中试样液溶解的残渣不能超过 1.5 mg,若超过 1.5 mg,需用四氢呋喃(4.4)稀释或重新进行净化。

9 测试结果的表示

苯并(a)芘含量按式(1)计算。

$$w = \frac{c \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- w——样品中苯并(a)芘含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- c——从标准工作曲线得到的待测液中苯并(a)芘的浓度,单位为纳克每微升(ng/μL);
- V——待测液体积,单位为微升(μL);
- m——样品质量,单位为克(g)。

计算结果在 0 μg/kg~10 μg/kg 之间时保留一位小数,计算结果大于 10 μg/kg 时保留到最接近的整数。

10 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的置信区间以 95%来计算。

10.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过重复性限 r,动植物油脂中苯并(a)芘的含量范围及重复性方程见表 1。如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

10.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过再现性限 R,动植物油脂中苯并(a)芘的含量范围及再现性方程见表 1。苯并(a)芘添加样品实验室间的测试分析结果见附录 D。

表 1 重复性限和再现性限方程

油脂类别	含量范围/(μg/kg)	重复性限 r	再现性限 R
植物油	0.5~50.0	$r=0.084\ 3\ m+0.313$	$R=0.100\ m+0.256$
动物油脂	0.2~50.0	$r=0.057\ 7\ m+0.066\ 4$	$R=0.193\ m+0.217$
注:m 为两次测定结果的算术平均值。			

附录 A (资料性附录)

Brockmann 氧化铝活度测定方法

A.1 活度定义

根据含水量的不同,中性氧化铝可以划分为五种活度等级。Brockmann 定义 I 级氧化铝为 450 ℃ 灼烧 12 h 的氧化铝,II、III、IV、V 级氧化铝是 I 级氧化铝分别加入 3%、6%、10%、15% 的水而制成。

A.2 测定

A.2.1 层析柱:玻璃层析柱,φ15 mm×H150 mm,下部垫少许脱脂棉,装入高度为 50 mm 氧化铝,敲实。

A.2.2 试剂:苯+石油醚(1+4)。

A.2.3 活度测试液的配置:按下列组合方式,分别取每种偶氮染料 20 mg,用试剂(A.2.2)定容于 50 mL 容量瓶中,配置成相应的染料混合溶液。

第一对(I):偶氮苯(azobenzene, AB)和对甲氧基偶氮苯(p-methoxyazobenzene, MAB);

第二对(II):MAB 和苏丹红 I (Sudan I, S I);

第三对(III):苏丹红 I 和苏丹红 III (Sudan III, S III);

第四对(IV):苏丹红 III 和对氨基偶氮苯(p-aminoazobenzene, AAB);

第五对(V):AAB 和对羟基偶氮苯(p-hydroxyazobenzene, HAB)。

A.2.4 分别取染料混合溶液 I、II、III、IV、V 各 10 mL,慢慢加到五支氧化铝层析柱内,待流尽后再加入 20 mL 试剂(A.2.2),待流尽后观察有色染料在柱上的迁徙情况,确定氧化铝的活度,如图 A.1 所示。若第一对染料溶液完全吸附在柱上时,该氧化铝活度为 I 级;若第一对染料溶液的 MAB 吸附在柱上、但 AB 流出,而第二对染料溶液的两个组分都吸附在柱上,则该氧化铝活度为 II 级;若第二对染料溶液的 MAB 组分流出,而第三对染料溶液的两个组分都吸附在柱上,则该氧化铝活度为 III 级;依次类推。

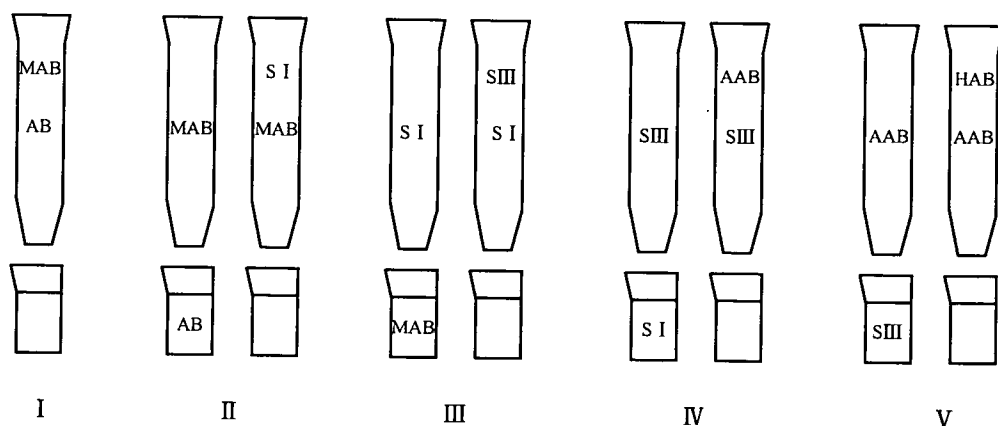


图 A.1 氧化铝活度的确定

附录 B
(资料性附录)
玻璃层析柱装置示意图

单位为厘米

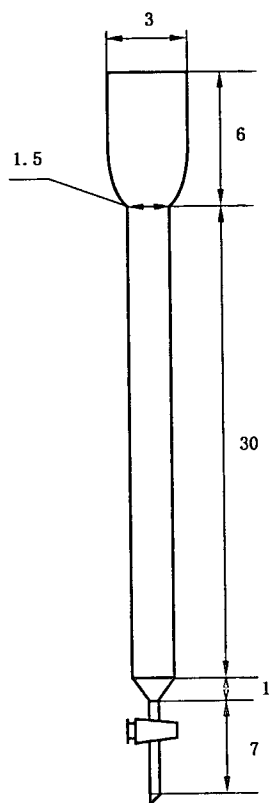


图 B.1 玻璃层析柱装置示意图

附 录 C
(资料性附录)
苯并(a)芘标准色谱图

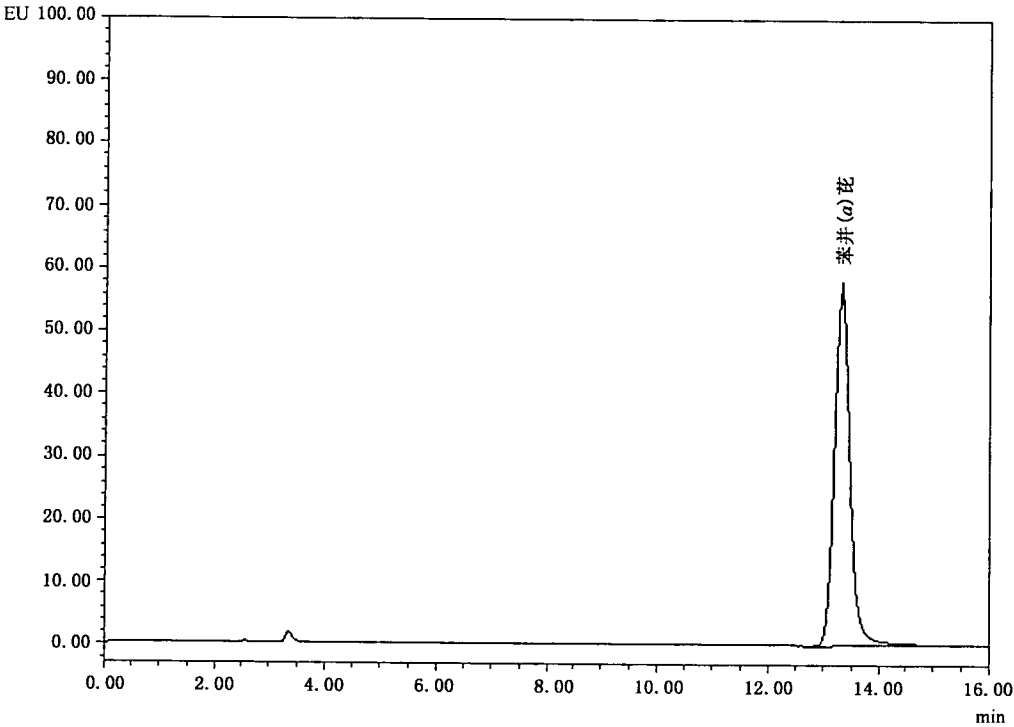


图 C.1 苯并(a)芘标准色谱图

附 录 D
(资料性附录)
实验室间结果比对

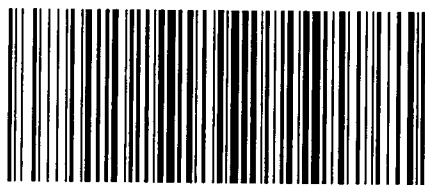
本方法经由 7 家实验室进行实验室间的测试分析,用鸡油和大豆油样品分别进行三个水平的添加回收实验,对得到的结果按照 GB/T 6379.2 进行精密度数据统计,统计结果见表 D.1。

表 D.1 统计分析结果

样品添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	鸡油样品				大豆油样品			
	0	0.5	10.0	50.0	0	0.5	10.0	50.0
实验室个数	7	7	7	7	7	7	7	7
平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.220	0.630	8.650	45.770	—	0.440	8.840	46.100
重复性标准差 S_r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.010	0.027	0.237	0.960	—	0.027	0.498	1.477
重复性变异系数/%	4.55	4.29	2.74	2.10	—	6.14	5.63	3.20
重复性限值 r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.028	0.076	0.664	2.688	—	0.076	1.394	1.136
再现性标准差 S_R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.126	0.139	0.609	3.236	—	0.033	0.498	1.719
再现性变异系数/%	57.27	22.06	7.04	7.07	—	7.50	5.63	3.73
再现性限值 R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.353	0.389	1.705	9.061	—	0.092	1.394	4.813

参 考 文 献

- [1] GB/T 5524 动植物油脂 扦样(GB/T 5524—2008, ISO 5555:2001, IDT)
-



GB/T 22509-2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-36560

定价: 14.00 元

打印日期: 2009年4月24日