



中华人民共和国国家标准

GB/T 24893—2010/ISO 15753:2006

动植物油脂 多环芳烃的测定

Animal and vegetable fats and oils—
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons

(ISO 15753:2006, IDT)

2010-06-30 发布

2011-01-01 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

前 言

本标准等同采用国际标准 ISO 15753:2006《动植物油脂 多环芳烃的测定》(英文版)。

为了便于使用,本标准对 ISO 15753:2006 进行了下列编辑性修改:

——“本国际标准”改为“本标准”;

——删除了国际标准的前言;

——规范性引用文件中用现行国家标准 GB/T 15687—2008《动植物油脂 试样的制备》代替 ISO 661:2003 Animal and vegetable fats and oils—Preparation of test sample;

——第 7 章及参考文献中用现行国家标准 GB/T 5524—2008《动植物油脂 扦样》代替 ISO 5555:2001 Animal and vegetable fats and oils—Sampling;

——用小数点“.”代替国际标准中作为小数点的逗号“,”;

——对公式进行编号。

本标准的附录 A 和附录 B 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。

本标准负责起草单位:南京财经大学。

本标准参与起草单位:上海交通大学、湖北省粮油食品质量监测站。

本标准主要起草人:袁建、汪海峰、鞠兴荣、杨晓蓉、吴时敏、熊宁。

动植物油脂 多环芳烃的测定

1 范围

本标准规定了采用高效液相色谱法测定动植物油脂中 15 种多环芳烃的相关术语和定义、原理、试剂、仪器设备、一般动植物油脂的前处理方法、椰子油和含短链脂肪酸植物油的前处理方法、高效液相色谱分析、结果表示和精密度。

本标准适用于一般动植物油脂以及椰子油和含短链脂肪酸的植物油中多环芳烃的测定。

本标准不适用于萘、蒾和芴等挥发性较强的组分定量分析以及棕榈油和橄榄果渣油中多环芳烃的测定。

荧蒾和苯并(*g,h,i*)芘的定量检测限为 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 。茚并(1,2,3-*c,d*)芘的定量检测限为 1 $\mu\text{g/kg}$ 。其余多环芳烃的定量检测限均为 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 。

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 15687 动植物油脂 试样的制备(GB/T 15687—2008,ISO 661:2003,IDT)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

多环芳烃 polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH

包含两个或两个以上稠合芳香烃环的化合物。按本标准规定条件测定其含量,以毫克每千克(mg/kg)计。

注:通常多环芳烃可分为含 2 个~4 个芳香环的轻多环芳烃和 5 个及 5 个以上芳香环的重多环芳烃。

示例:

轻多环芳烃包括:萘(CAS RN[91-20-3]),蒾(CAS RN[83-32-9]),蒾烯(CAS RN[208-96-8]),芴(CAS RN[86-73-7]),蒽(CAS RN[120-12-7]),菲(CAS RN[85-01-8]),荧蒾(CAS RN[206-44-0]),蒎(CAS RN[218-01-9]),苯并(*a*)蒽(CAS RN[56-55-3]),芘(CAS RN[129-00-0])。

重多环芳烃包括:苯并(*a*)芘(CAS RN[50-32-8]),苯并(*b*)荧蒾(CAS RN[205-99-2]),苯并(*k*)荧蒾(CAS RN[207-08-9]),苯并(*g,h,i*)芘(CAS RN[191-24-2]),二苯并(*a,h*)蒽(CAS RN[53-70-3]),茚并(1,2,3-*c,d*)芘(CAS RN[193-39-5])。

4 原理

试样中的多环芳烃用乙腈-丙酮混合液萃取,然后依次用 C_{18} 反相萃取柱和硅酸镁载体键合固定相柱净化,通过高效液相色谱(HPLC)分离,测量在不同激发波长和发射波长处的荧光强度,测定各种多环芳烃的含量。

5 试剂

警告:应注意危险品操作规则,操作时应遵循技术上、组织上和个人的安全措施。

除非另有说明,仅使用分析纯试剂。

所用溶剂在使用前应检查其质量:将溶剂蒸发浓缩约 1 000 倍(300 mL 到 300 μ L)后,用 HPLC 分析,色谱图的多环芳烃保留时间处不得出现色谱峰。

5.1 甲醇:超纯(ultra resi-analysed)级¹⁾。

5.2 正己烷:色谱纯¹⁾。

5.3 乙腈:色谱纯¹⁾。

5.4 丙酮:色谱纯¹⁾。

5.5 二氯甲烷:色谱纯¹⁾。

5.6 甲苯:色谱纯¹⁾。

5.7 水:色谱纯¹⁾。

5.8 四氢呋喃:色谱纯¹⁾。

5.9 混合溶剂 1:乙腈-丙酮混合液,6+4。

每个样品的用量:一般方法为 41 mL,测定椰子油的特定方法为 36 mL。

5.10 混合溶剂 2:乙腈-丙酮混合液,8+2。

每个样品的用量:测定椰子油的特定方法为 2×11 mL。

5.11 混合溶剂 3:正己烷-二氯甲烷混合液,3+1。

每个样品的用量:一般方法为 7 mL,测定椰子油的特定方法为 2×7 mL。

5.12 四氢呋喃-甲醇混合液:5+5。

5.13 16 种多环芳烃标准甲苯溶液²⁾:100 μ g/mL,萘、苊烯、苊、芴、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并(a)蒽、蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、苯并(a)芘、二苯并(a,h)蒽、苯并(g,h,i)芘、茚并(1,2,3-c,d)芘。在-20℃下保存。

使用前,将标准溶液取出并平衡温度至室温,平衡时间至少 1 h 以上。

注:苊烯没有荧光性,因此不能用这些方法测定。

5.14 标准储备溶液:200 ng/mL(200 μ g/L)。

用 250 μ L 注射器(6.11)吸取 100 μ L 标准溶液(5.13),注入到 50 mL 容量瓶(6.20)中,用乙腈(5.3)稀释至刻度。

5.15 标准工作溶液:50 ng/mL(50 μ g/L)。

用 250 μ L 注射器(6.11)吸取 250 μ L 标准储备溶液(5.14),注入到 750 μ L 四氢呋喃-甲醇混合液(5.12)或 750 μ L 乙腈(5.3)中。

5.16 C_{18} 键合固定相萃取柱³⁾:固定相 2 g,体积 12 mL。

5.17 硅酸镁载体键合固定相萃取柱³⁾:固定相 500 mg,体积 3 mL。

5.18 氮气:压力调节至 34.5 kPa(5 psi,约 1.5 L/min)。

6 仪器设备

实验室常规仪器,以及下列特殊的仪器。

因塑料制品可能含有多环芳烃,一般应使用玻璃容器,可使用一次性的玻璃管。

6.1 离心机:转速 $\geq 4\,000$ r/min,能放置 100 mL 和 10 mL 离心管。

6.2 带二元梯度洗脱的 HPLC 系统:

——配有 1 L 的溶剂储液器,流动相在线过滤器;

1) 可从 Baker 公司购得。给出这一信息仅为了方便本标准的使用者,并不代表本标准对这些产品的指定认可。能够获得相同结果的等效产品同样可以使用。

2) 美国环保署(EPA)优先监测的多环芳烃,可从 Promochem 公司购得。

3) 可从 Varian 公司购得。给出这一信息仅为了方便本标准的使用者,并不代表本标准对这些产品的指定认可。能够获得相同结果的等效产品同样可以使用。

- 泵；
- 自动进样器；
- 柱温可调节至 25 ℃；
- 对各种激发/发射波长可全过程扫描的荧光检测器；
- 计算机辅助数据采集和处理系统。

6.3 C₁₈反相键合固定相色谱柱⁴⁾:长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,适于多环芳烃的分析。

6.4 涡旋混合器。

6.5 氮吹仪⁵⁾:10 mL 管(可选),或水浴(6.6)。

建议操作条件:

- 水浴温度:35 ℃；
- 氮气压力:34.5 kPa。

6.6 水浴:控温 35 ℃。

6.7 天平:感量 0.1 mg。

6.8 离心管:容量 100 mL(每个样品一个)。

6.9 锥形离心管:容量 11 mL(每个样品三个),具聚四氟乙烯 PTFE 隔膜垫的螺旋封帽(每个样品一个)。

6.10 量筒。

6.11 微量注射器:250 μL。

6.12 注射器:1 000 μL。

6.13 刻度吸量管:5 mL。

6.14 注射器:5 mL,配有与固相萃取(SPE)柱匹配的封帽。

6.15 自动进样器用瓶。

6.16 微量瓶:250 μL。

6.17 超声波水浴:水温不高于 40 ℃。

6.18 巴斯德移液管(巴氏吸管):顶端加脱脂棉。

6.19 固定架⁶⁾:由支架座和夹子构成,以固定固相萃取柱;或者配置一个自动的固相萃取工作站。

注:根据使用的固相萃取样品处理站的具体情况,萃取方法可能需要调整(如时间、压力和体积)。

6.20 容量瓶:50 mL。

7 扦样

所取样品应具有代表性,且在运输和储藏的过程中无损坏或变质。

本标准不规定扦样方法,推荐采用 GB/T 5524 规定的方法。

8 试样制备

按 GB/T 15687 进行。取样前,液体试样应放置于室温下,并经磁力搅拌器混匀。

固体试样应全部熔化或将部分核心样品熔化并均质。

4) 可使用 Vydac 公司的编号为 201TP54 的色谱柱。给出这一信息仅是为了方便本标准的使用者,并不代表对这些产品的指定认可。能够获得相同结果的等效产品同样可以使用。

5) 可使用 Zymark 公司的 Turbovap LV 蒸发器。给出这一信息仅是为了方便本标准的使用者,并不代表对这些产品的指定认可。能够获得相同结果的等效产品同样可以使用。

6) 可使用 Zymark 公司的 Rapid Trace。给出这一信息仅是为了方便本标准的使用者,并不代表对这些产品的指定认可。能够获得相同结果的等效产品同样可以使用。

9 油脂中多环芳烃(PAH)的测定步骤——一般前处理方法

9.1 一般要求

由于油脂含有短链和长链脂肪酸,当环境温度高于 20 °C 时,短链脂肪酸的溶解度会增加。为获得可重复的结果,实验室的环境温度应控制在 ≤ 20 °C,这也是萃取椰子油(或含短链脂肪酸的植物油)中多环芳烃的一个重要条件。

测定前,应用正己烷(5.2)将所有容器冲洗三次。

为计算萃取的回收率(9.3),每个样品系列都应进行空白试验(9.2),标准溶液和样品的萃取条件应完全一致。回收率应在 70%~110%之间。平均回收率参见表 A.1。

定量分析时,两份试样应分别进行萃取和测定,以两份试样测定结果的平均值作为最后结果。

整个分析不可能在一天完成。样品萃取液应在 ≤ -18 °C 的冷冻条件下储存过夜。

第一天:按图 A.1 所示完成步骤 1,步骤 2 和步骤 3 中的 C_{18} 固相萃取柱上净化过程。

第二天:完成步骤 3 中的在硅酸镁柱上净化过程并准备样品分析用的 HPLC 系统(参见图 A.1)。

第三天:进行样品分析(参见表 A.2)。

9.2 空白试验

为了确证溶剂和固相萃取柱不存在污染,应先用空白样品(溶剂混合液,不加油样)对固相萃取柱进行净化测试(按照 9.5、9.6 和第 11 章进行)。得到的色谱图上应没有影响待测物的色谱峰。如果色谱图上含有干扰物,应确定干扰物的来源并加以消除。由于每次空白测定值通常不一致,所以不能用来校正样品值。

9.3 回收率的测定(无基体)

固相萃取柱的萃取效率用标准溶液的测试来验证。用 250 μ L 注射器(6.11)吸取 250 μ L 标准工作溶液(5.15),注入 1 750 μ L 混合溶剂 1(5.9)中,转移至 C_{18} 固相萃取柱后按照 9.5、9.6 和第 11 章进行试验。

警告:用氮气流(见 9.5.6)除去溶剂时,不可吹干,瓶内应保留约 50 μ L 溶液,以免挥发性的多环芳烃损失。

9.4 萃取(液-液萃取)

9.4.1 分离操作流程参见图 A.1。

9.4.2 称取试样约 2.5 g(精确至 1 mg)于 100 mL 离心管(6.8)中,加入 10 mL 混合溶剂 1(5.9)。

9.4.3 用涡旋混合器(半速)振荡离心管 30 s 后,将离心管放入超声波水浴(6.17)中保持 5 min。

9.4.4 再将离心管放入离心机(6.1),在 4 000 r/min 转速下离心 5 min。

9.4.5 用巴斯德移液管(6.18)小心移取离心管上层溶液,并转移至已称量的锥形管(6.9)中。

9.4.6 在 35 °C 水浴(6.6)或氮吹仪上(6.5)通氮气流(5.18)蒸发锥形管中的溶剂 30 min~40 min。

9.4.7 再用 10 mL 混合溶剂 1(5.9)按 9.4.3~9.4.5 重复提取二次,萃取液于同一锥形管中。在 35 °C 水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上用氮气流(5.18)浓缩萃取液。

萃取物约 200 mg~800 mg。如萃取物质量大于 800 mg,一般前处理方法(第 9 章)是不适用的,应采用适用椰子油的前处理方法(第 10 章)。

9.5 C_{18} 键合固相萃取柱净化(固-液萃取)

9.5.1 固相萃取柱活化:将固相萃取柱(5.16)放在固定架(6.19)上。先用甲醇(5.1)润洗 2 次,每次 12 mL,再用乙腈(5.3)润洗 2 次,每次 12 mL。溶剂在大气压下流出。

9.5.2 将另一已称量的锥形管(6.9)放在固相萃取柱(5.16)下面。

9.5.3 用注射器(6.12)或刻度吸量管(6.13)吸取 2 mL 混合溶剂 1(5.9)加入到装有萃取物的锥形管(9.4.6)中。将锥形管置于涡旋混合器(6.4)上振荡 15 s,然后离心 30 s。用巴斯德移液管(6.18)将上层溶液转至固相萃取柱(5.16)中。重复上述操作 2 次。合并收集从柱中洗脱出的溶剂和淋洗溶剂。

- 9.5.4 将 5 mL 混合溶剂 1(5.9)从固相萃取柱的顶端倒入,洗脱液在大气压下流出。
- 9.5.5 用注射器(6.14)将空气压入固相萃取柱,以洗脱剩余的溶剂和任何可能滞留在固定相中的多环芳烃。
- 9.5.6 在 35 ℃水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上用氮气流除去溶剂。萃取物应不超过 50 mg。
- 9.5.7 用注射器(6.12)吸取 1 mL 正己烷(5.2),稀释残留物。密封锥形管,储存于-18 ℃下备用。

9.6 硅酸镁键合固相萃取柱净化(固-液萃取)

- 9.6.1 萃取液(9.5.7)使用前应在室温下放置平衡 1 h 以上。
- 9.6.2 固相萃取柱活化:将固相萃取柱(5.17)放在固定架(6.19)上。先用二氯甲烷(5.5)润洗 5 次,每次 3 mL;再用正己烷(5.2)润洗 4 次,每次 3 mL。
- 9.6.3 将另一已称量的锥形管(6.9)放在固相萃取柱(5.17)下面。
- 9.6.4 用注射器(6.12)或刻度吸量管(6.13)吸取 1 mL 混合溶剂 3(5.11)加入到装有萃取液的锥形管(9.6.1)中。将锥形管置于涡旋混合器(6.4)上振摇 15 s,然后用巴斯德移液管(6.18)将溶液转移至固相萃取柱(5.17)中。再用混合溶剂 3(5.11)冲洗锥形管二次,每次 2 mL,将洗涤液同样转移至固相萃取柱上。合并收集从柱中洗脱出的溶剂和淋洗溶剂。

为防止交叉污染,要注意避免移液管和锥形管接触。

- 9.6.5 用 4 mL 混合溶剂 3(5.11)淋洗固相萃取柱。用注射器(6.14)将空气压入固相萃取柱内,以洗脱滞留溶剂。
- 9.6.6 在 35 ℃水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上,用氮气流(5.18)浓缩溶液至约 1 mL(需 10 min~15 min)。加入约 0.5 mL 甲苯(5.6)(保持液),继续蒸发至约 50 μL。溶剂不可完全除去。
- 9.6.7 通过称量锥形管中萃取物的质量和甲苯的密度计算加入溶剂[甲醇-四氢呋喃(5.12)或乙腈(5.3)]的体积,加入计算量(V_{add})的溶剂使总体积为 250 μL。

加入溶剂的体积(V_{add})按式(1)计算:

$$V_{add} = 250 - \frac{m}{d} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

V_{add} ——加入的溶剂[甲醇-四氢呋喃(5.12)或乙腈(5.3)]体积,单位为微升(μL);

m ——萃取物的质量,单位为毫克(mg);

d ——甲苯的密度(0.866 9 kg/m³)。

- 9.6.8 将样品转移至微量瓶(6.16)中,微量瓶置于 HPLC 自动进样器瓶(6.15)内。

10 油脂中多环芳烃的测定步骤——适用于椰子油的前处理方法

10.1 第一次萃取(液-液萃取)

- 10.1.1 分离操作流程参见图 A.2。
- 10.1.2 称取约 2 g 样品(精确至 1 mg)于 100 mL 离心管(6.8)中,加入 10 mL 混合溶剂 1(5.9)。
- 10.1.3 离心管于涡旋混合器(半速)中振荡 30 s 后再将其放入超声波水浴(6.17)中保持 5 min。
- 10.1.4 再将离心管放入离心机(6.1),在 4 000 r/min 转速下离心 5 min。
- 10.1.5 用巴斯德移液管(6.18)小心移取上层溶液,并转移至锥形管中(6.9)。
- 10.1.6 在 35 ℃水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上通氮气流(5.18)蒸发锥形管中的溶剂 30 min~40 min。
- 10.1.7 再用 10 mL 混合溶剂 1(5.9)重复萃取二次,萃取液于同一锥形管中。在 35 ℃水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上用氮气流浓缩萃取液。

10.2 第二次萃取(液-液萃取)

- 10.2.1 用注射器(6.12)或刻度吸量管(6.13)吸取 2 mL 混合溶剂 1(5.9)加入到装有萃取物的锥形管(10.1.7)中。将锥形管置于涡旋混合器(6.4)上振荡 15 s,离心 30 s。将萃取液均分成两等份,分别放

入两个已称量的锥形管(6.9)中。

为防止交叉污染,切勿使移液管和锥形管接触。

10.2.2 按照 10.2.1 中的步骤重复萃取两次,萃取液同样均分成两等份,分别放入上述锥形管(10.2.1)中。

10.2.3 在 35℃ 水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上,用氮气流(5.18)浓缩两份萃取液。每份浓缩液中萃取物约为 250 mg。

10.3 C₁₈键合固相萃取柱净化(固-液萃取)

10.3.1 固相萃取柱活化:将两根固相萃取柱(5.16)放在固定架(6.19)上。先用甲醇(5.1)润洗 2 次,每次 12 mL,再用乙腈(5.3)润洗 2 次,每次 12 mL。溶剂在大气压下流出。

10.3.2 将一个已称量的锥形管(6.9)放在固相萃取柱(5.16)下面。

10.3.3 用注射器(6.12)或刻度吸量管(6.13)吸取 2 mL 混合溶剂 2(5.10)加入到装有萃取物的锥形管(10.2.3)中。将锥形管置于涡旋混合器(6.4)上振荡 15 s。用巴斯德移液管(6.18)将每个管中的萃取液全部转入到对应的固相萃取柱(5.16)中。用混合溶剂 2(5.10)冲洗锥形管两次,每次 2 mL,将洗涤液转移至相应的固相萃取柱上。合并收集从柱中洗脱出的溶剂和淋洗溶剂。

10.3.4 用 5 mL 混合溶剂 2(5.10)淋洗固相萃取柱(注意不要将空气压入固相萃取柱内)。

10.3.5 在 35℃ 水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上用氮气流(5.18)除去溶剂。萃取物约为 50 mg~100 mg。

10.3.6 用注射器(6.12)吸取 1 mL 正己烷(5.2),稀释残留物。密封锥形管,储存于-18℃下待第二天使用。

10.4 硅酸镁键合固相萃取柱净化(固-液萃取)

10.4.1 萃取液(10.3.6)使用前应在室温下放置平衡 1 h 以上。

10.4.2 固相萃取柱活化:将固相萃取柱(5.17)放在架子(6.19)上。先用二氯甲烷(5.5)润洗 5 次,每次 3 mL,再用正己烷(5.2)润洗 4 次,每次 3 mL。

10.4.3 将已称量的锥形管(6.9)放在固相萃取柱(5.17)下面。

10.4.4 用注射器(6.12)或刻度吸量管(6.13)吸取 1 mL 混合溶剂 3(5.11)加入到装有萃取液的锥形管中。将锥形管置于涡旋混合器(6.4)上振荡 15 s,然后用巴斯德移液管(6.18)将溶液转移至固相萃取柱(5.17)中。用混合溶剂 3(5.11)冲洗锥形管二次,每次 2 mL,将洗涤液转移至固相萃取柱上。合并收集从柱中洗脱出的溶剂和淋洗溶剂。

10.4.5 用 4 mL 混合溶剂 3(5.11)淋洗固相萃取柱(注意不要将空气压入固相萃取柱内)。

10.4.6 在 35℃ 水浴(6.6)或氮吹仪(6.5)上,用氮气流(5.18)浓缩溶液至约 1 mL(需 10 min~15 min)。合并两次萃取液于同一锥形管中(将一个锥形管中的萃取液转移至另一个锥形管中)。用正己烷(5.2)润洗空的锥形管 3 次,每次 1 mL。用注射器(6.12)加入约 0.5 mL 甲苯(保持液)(5.6),继续蒸发至约 50 μL。溶剂不可完全除去。

10.4.7 通过称量锥形管中萃取物的质量和甲苯的密度计算加入溶剂[甲醇-四氢呋喃(5.12)或乙腈(5.3)]的体积,加入计算量(V_{add})的溶剂使总体积为 200 μL。

加入溶剂的体积(V_{add})按式(2)计算:

$$V_{add} = 200 - \frac{m}{d} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

V_{add} ——加入的溶剂[甲醇-四氢呋喃(5.12)或乙腈(5.3)]体积,单位为微升(μL);

m ——萃取物的质量,单位为毫克(mg);

d ——甲苯的密度(0.866 9 kg/m³)。

10.4.8 将萃取物转移至微量瓶(6.16)中,微量瓶置于 HPLC 自动进样器瓶(6.15)内。

11 高效液相色谱分析(HPLC)

11.1 操作条件

流动相:混合溶剂 A:乙腈,混合溶剂 B:乙腈-水(5+5)。

流速:1.2 mL/min。

进样量:20 μ L。

柱温:25 $^{\circ}$ C。

表 1 列出了溶剂洗脱程序。梯度洗脱程序的条件应根据选用的色谱柱而调整。

表 1 反相 C_{18} 柱的梯度洗脱程序

时间/ min	混合溶剂成分 A/ %	混合溶剂成分 B/ %
0	0	100
5	0	100
27	60	40
36	100	0
41	100	0
43	0	100
45	0	100

11.2 检测参数

激发和发射波长会因不同仪器而有微小变化。为了测定最大激发和发射波长,使用 16 种多环芳烃的标准工作溶液(5.15)进行测定,以获得每个化合物的谱图。操作如下:首先,在 300 nm~550 nm 间任意激发波长处扫描发射能量,确定最大发射波长(见表 2)。然后,在 200 nm~350 nm 间扫描激发能量,并结合先前测定的发射波长结果,确定最大激发波长。

对七组保留时间相近的化合物(见表 2)中的每一组,选择一套尽可能接近每个化合物最大波长的激发/发射波长。

作为参照,表 2 列出了通过 HP 1100 荧光计测量而选定的一些波长。

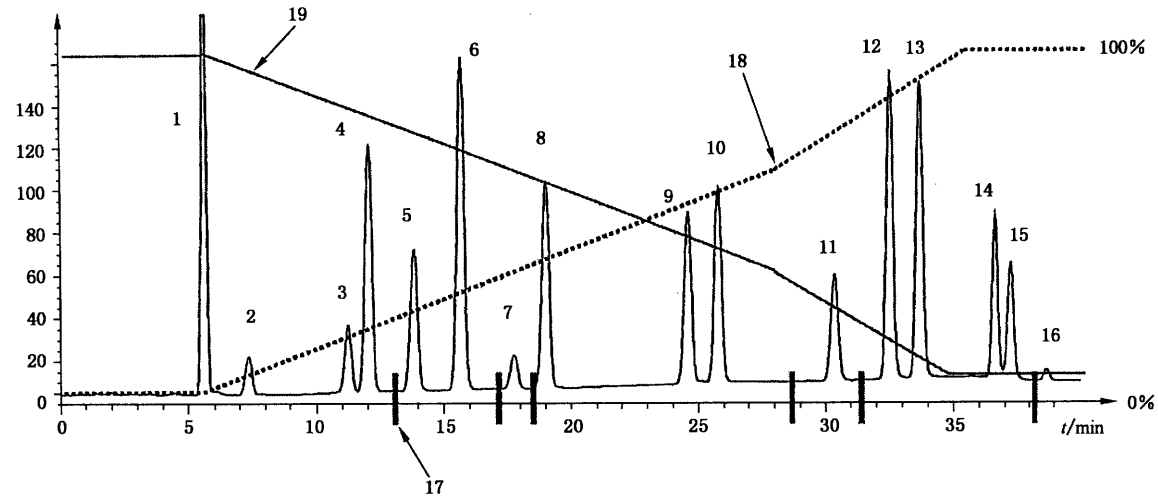
表 2 测试方案

组	组分	时间/ min	激发波长/ nm	发射波长/ nm
1	萘 蒽 苊	0	270	324
2	菲 蒽	12.6	248	375
3	荧蒽	16.4	280	462
4	芘 苯并(a)蒽 蒽	18.05	270	385
5	苯并(b)荧蒽	28.0	256	446

表 2 (续)

组	组分	时间/ min	激发波长/ nm	发射波长/ nm
6	苯并(k)荧蒹 苯并(a)芘 二苯并(a,h)蒽 苯并(g,h,i)花	31.1	292	410
7	茚并(1,2,3-c,d)芘	38.0	274	507

在上述条件下,得到了 16 种多环芳烃的标准溶液的色谱图,如图 1 所示。



- | | |
|------------|-----------------------|
| 1——甲苯; | 11——苯并(b)荧蒹; |
| 2——萘; | 12——苯并(k)荧蒹; |
| 3——苊; | 13——苯并(a)芘; |
| 4——芴; | 14——二苯并(a,h)蒽; |
| 5——菲; | 15——苯并(g,h,i)花; |
| 6——蒽; | 16——茚并(1,2,3-c,d)芘; |
| 7——荧蒹; | 17——波长的改变; |
| 8——芘; | 18——混合溶剂 A(乙腈); |
| 9——苯并(a)蒽; | 19——混合溶剂 B(乙腈-水 5+5)。 |
| 10——蒽; | |

图 1 标准工作溶液(5. 15)的色谱图

11.3 试样和标准品的分析

试样和标准品应至少进样两次。同一试样两次进样峰面积的相对标准偏差不应超过 5%。如果标准偏差超过 5%,应将 HPLC 的条件优化后,再次对试样和标准品进样。

进样次序应如下:

- a) 标准溶液;
- b) 标准溶液的萃取液;
- c) 试样。

作为参照,表 A. 2 给出了详细的进样次序。

试样中多环芳烃的存在,是通过比较样品色谱图的保留时间和最相近参考样品色谱图的保留时间来确定的。图 A. 3 是一个初榨橄榄油样品的色谱图。

11.4 检验是否存在多环芳烃的实验

每个试样进样两次,一次记录每个化合物的发射光谱,另一次记录激发光谱。通过与参考谱图的比对来确认目标化合物的存在。

12 结果表示

计算前先确认下列几项:

- 空白样品质量;
- 同一个试样两次进样的相对标准偏差(不应超过 5%);
- 每个多环芳烃的回收率(表 A.1)。

采用外标法计算。样品中单个多环芳烃含量(c_i)以微克/千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(3)计算:

$$c_i = \frac{A_i \times c_{ir} \times V}{A_{ir} \times m} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- A_i ——同一试样溶液中每个多环芳烃的峰面积(两次进样的平均值);
- A_{ir} ——标准工作溶液中每个多环芳烃的峰面积(两次进样的平均值);
- c_{ir} ——标准工作溶液中每个多环芳烃的浓度,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- V ——最终得到的萃取液的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样质量,单位为克(g)。

对于定量分析,每个试样应萃取两次。每个多环芳烃的含量都是两次测定结果的平均值,精确至 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

13 精密度

13.1 实验室间试验

附录 B 详述了本标准精密度的实验室间比对测试结果。重复性限和再现性限的值用 95% 的置信区间表达。超出给定的检测浓度范围和多环芳烃种类,这些值可能不适用。

13.2 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测定结果的绝对差值超过表 3 中给出的重复性限(r)的情况不超过 5%。

表 3 重复性限

单个多环芳烃的浓度(c)/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0~10	10~100
重复性限(r)/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$0.37 \times c$	$0.12 \times c + 3.7$

其中 c 是两次测试结果的平均值,以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。

13.3 再现性

在不同实验室,由不同的操作者使用不相同的设备,按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测定结果的绝对差值超过表 4 中给出的再现性限(R)的情况不超过 5%。

表 4 再现性限

单个多环芳烃的浓度(c)/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0~10	10~40	40~100
再现性限(R)/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	$1.1 \times c$	$0.86 \times c + 1.5$	40

其中 c 是两次测试结果的平均值,以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。

14 测试报告

测试报告应详细说明：

- 标识样品的全部信息；
- 本标准所涉及的测试方法；
- 本标准没有具体说明的、或者被认为是可选性的，以及所有可能影响结果的操作细节；
- 测定结果及表示单位；
- 每个多环芳烃的回收率。

附 录 A
(资料性附录)
回收率、流程图、色谱图和进样次序

A.1 回收率见表 A.1。

表 A.1 油中多环芳烃的平均回收率

化合物	一般方法	适用椰子油的方法
菲	>70%	>70%
蒽	>70%	>70%
荧蒽	>70%	>70%
芘	>70%	>70%
苯并(a)蒽	>70%	>70%
蒾	>70%	>70%
苯并(b)荧蒽	>70%	>70%
苯并(k)荧蒽	>70%	>70%
苯并(a)芘	>70%	>60%
二苯并(a,h)蒽	>70%	>60%
苯并(g,h,i)芘	>60%	>50%
茚并(1,2,3-c,d)芘	>70%	>50%

A.2 流程图见图 A.1、图 A.2。

第1步

多环芳烃的预浓缩

2.5 g油

萃取3次：每次用10 mL乙腈-丙酮（6+4）
涡流振荡30 s，超声水浴5 min，
4 000 r/min转速下离心5 min
→合并3次萃取液的上层溶液

第2步

油脂残留物中多环芳烃的萃取

萃取3次：每次用2 mL乙腈-丙酮（6+4）
涡流振荡15 s，离心30 s
→合并3次萃取液的上层溶液

第3步

多环芳烃的净化：两次固相萃取
第一次净化： C_{18} 固相萃取柱（2 g）

柱活化：24 mL甲醇+24 mL乙腈

合并3次提取液并加入 C_{18} 固相萃取柱中
淋洗液：5 mL乙腈-丙酮（6+4）

洗脱

35 ℃下氮气流蒸发浓缩
→油脂残留物（约50 mg）

用1 mL正己烷稀释

第二次净化：硅酸镁固相萃取柱（500 mg）

柱活化：15 mL二氯甲烷+12 mL正己烷

加入萃取液（1 mL正己烷）
润洗样品管3次，每次用1 mL正己烷-二氯甲烷
（3+1）
淋洗液：4 mL正己烷-二氯甲烷（3+1）

洗脱

35 ℃下氮气流蒸发浓缩至1 mL
加入500 μ L甲苯（保持液）
→35 ℃下氮气流蒸发浓缩至20 μ L

用四氢呋喃-甲醇（5+5）或乙腈稀释
（最后体积为250 μ L）

HPLC分离测得荧光强度

图 A.1 分离步骤的流程图：一般方法

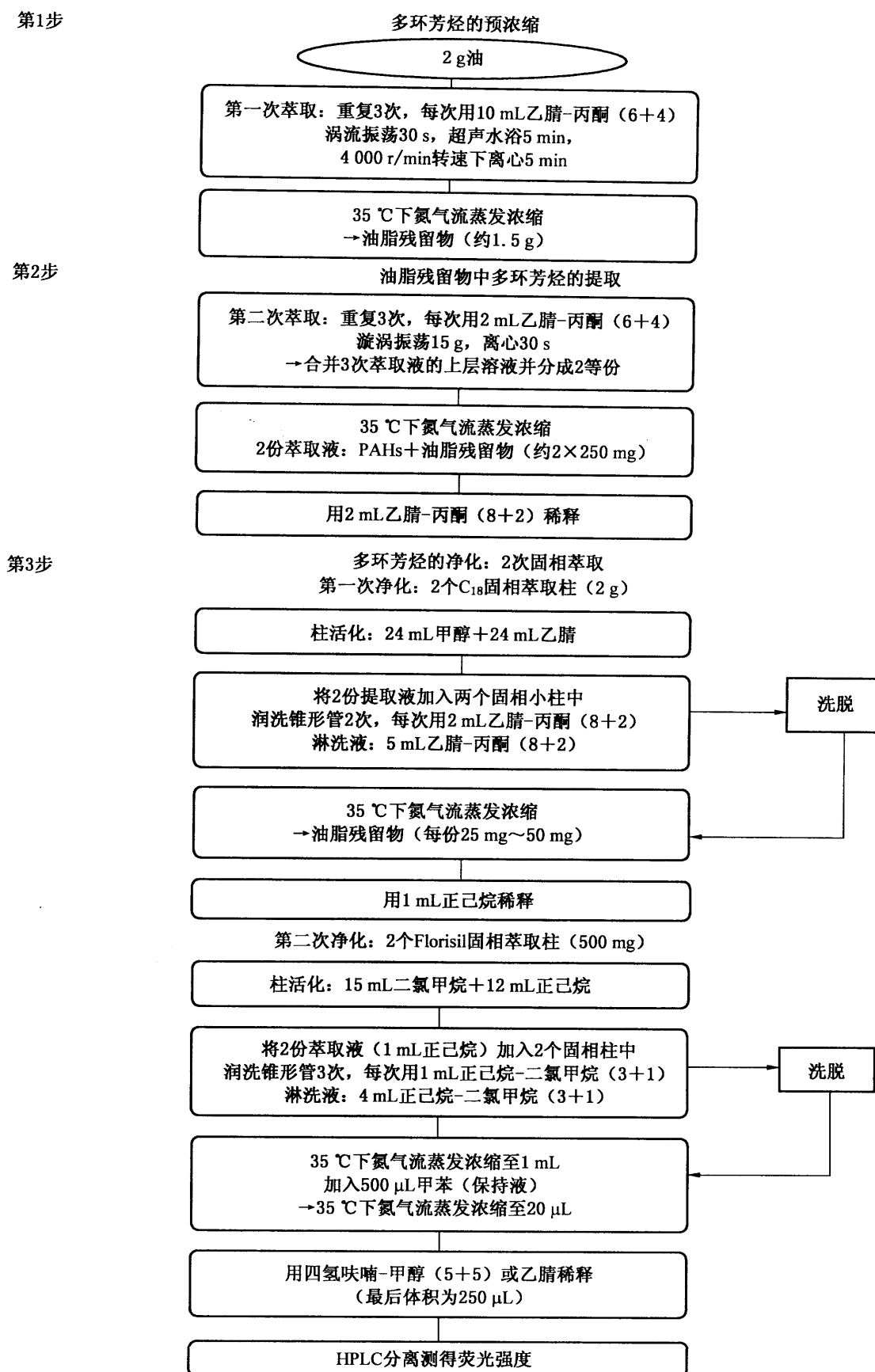
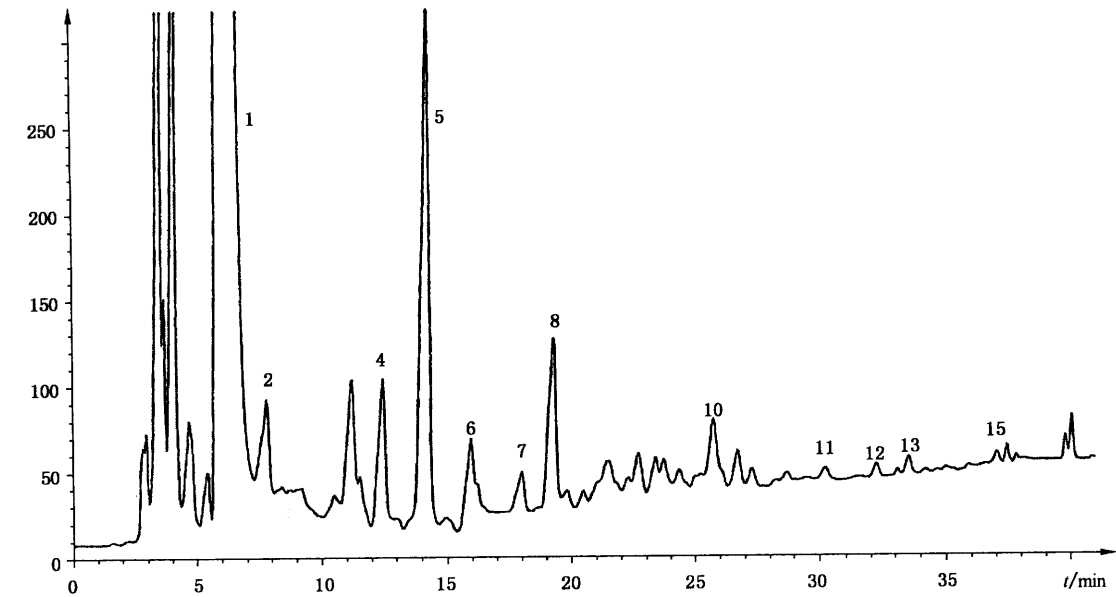


图 A.2 分离步骤的流程图:适用于椰子油的特定方法

A.3 色谱图见图 A.3。



- 1——甲苯(溶剂) 9——苯并(a)蒽 nd
2——萘(10.2 μg/kg) 10——蒽(1.0 μg/kg)
3——芘 nd 11——苯并(b)荧蒽(0.4 μg/kg)
4——芴(2.2 μg/kg) 12——苯并(k)荧蒽(0.2 μg/kg)
5——菲(15.2 μg/kg) 13——苯并(a)芘(0.2 μg/kg)
6——蒽(1.4 μg/kg) 14——二苯并(a,h)蒽 nd
7——荧蒽(4.2 μg/kg) 15——苯并(g,h,i)芘(0.4 μg/kg)
8——芘(4.3 μg/kg) 16——茚并(1,2,3-c,d)芘 nd
nd 表示未检测到

图 A.3 初榨橄榄油样品的色谱图

A.4 进样次序见表 A.2。

表 A.2 HPLC 进样次序

列		瓶	进样次数	采集方法
多环芳烃含量的 测定 总分析时间:23 h	1	四氢呋喃-甲醇(5+5)	1	特定波长
	2	空白(9.2)	1	特定波长
	3	标准溶液,50 ng/mL(5.15)	2	特定波长
	4	标准溶液的萃取液(9.3)	2	特定波长
	5	样品 1	2	特定波长
	6	标准溶液,50 ng/mL(5.15)	2	特定波长
	7	样品 2	2	特定波长
	8	样品 3	2	特定波长
	9	标准溶液,50 ng/mL(5.15)	2	特定波长
	10	样品 4	2	特定波长
	11	样品 5	2	特定波长
	12	标准溶液,50 ng/mL(5.15)	2	特定波长
	13	样品 6	2	特定波长
	14	样品 7	2	特定波长
	15	标准溶液,50 ng/mL(5.15)	2	特定波长

表 A.2 (续)

列		瓶	进样次数	采集方法
验证是否存在 多环芳烃	1	样品 1	1	发射
	2	样品 2	1	发射
	3	样品 3	1	发射
	4	样品 4	1	发射
	5	样品 5	1	发射
	6	样品 6	1	发射
	7	样品 7	1	发射
	8	样品 1	1	激发
	9	样品 2	1	激发
	10	样品 3	1	激发
	11	样品 4	1	激发
	12	样品 5	1	激发
	13	样品 6	1	激发
	14	样品 7	1	激发

附 录 B
(资料性附录)
联合实验室测试结果

2002/2003 年法国油脂协会(ITERG)组织 19 个实验室进行了联合实验室研究,每个实验室对每个样品测试两次,按照 ISO 5725-2 对数据进行统计分析,结果见表 B.1。

表 B.1 联合实验室测试结果

代码	多环芳烃	实验室数	平均	s_r	RSD(r)	r	s_R	RSD(R)	R
A	菲	15	39.95	4.96	12.4%	13.89	13.27	33.2%	37.15
A	蒽	15	31.60	3.47	11.0%	9.71	10.56	33.4%	29.55
A	荧蒽	13	49.70	3.57	7.2%	9.99	13.68	27.5%	38.31
A	芘	13	70.36	4.67	6.6%	13.07	23.47	33.4%	65.71
A	苯并(a)蒽	15	30.64	2.21	7.2%	6.20	9.56	31.2%	26.78
A	蒾	15	34.34	2.39	6.9%	6.68	10.23	29.8%	28.63
A	苯并(b)荧蒽	15	26.00	2.25	8.7%	6.30	8.61	33.1%	24.11
A	苯并(k)荧蒽	14	20.23	1.23	6.1%	3.44	6.76	33.4%	18.94
A	苯并(a)芘	12	18.19	1.23	6.8%	3.44	4.44	24.4%	12.42
A	二苯并(a,h)蒽	15	18.78	2.46	13.1%	6.88	7.24	38.5%	20.27
A	苯并(g,h,i)花	13	11.63	1.56	13.5%	4.38	4.11	35.3%	11.51
A	茚并(1,2,3-c,d)芘	14	12.91	2.88	22.3%	8.06	5.93	45.9%	16.61
B	菲	17	82.57	4.08	4.9%	11.42	13.94	16.9%	39.02
B	蒽	17	74.72	3.93	5.3%	10.99	14.30	19.1%	40.05
B	荧蒽	17	83.18	3.43	4.1%	9.60	14.23	17.1%	39.83
B	芘	17	112.81	8.25	7.3%	23.09	18.82	16.7%	52.69
B	苯并(a)蒽	17	70.47	3.75	5.3%	10.51	11.62	16.5%	32.54
B	蒾	16	80.96	4.77	5.9%	13.35	13.97	17.3%	39.11
B	苯并(b)荧蒽	17	68.95	4.04	5.9%	11.30	13.32	19.3%	37.30
B	苯并(k)荧蒽	17	55.95	2.72	4.9%	7.62	9.80	17.5%	27.45
B	苯并(a)芘	17	57.78	3.95	6.8%	11.07	12.61	21.8%	35.30
B	二苯并(a,h)蒽	17	48.92	3.46	7.1%	9.69	14.43	29.5%	40.40
B	苯并(g,h,i)花	17	41.99	3.05	7.3%	8.53	16.01	38.1%	44.82
B	茚并(1,2,3-c,d)芘	15	45.11	5.77	12.8%	16.15	18.00	39.9%	50.39
C	菲	17	7.67	0.72	9.4%	2.01	5.35	69.8%	14.98
C	蒽	15	3.59	0.58	16.1%	1.62	0.86	23.9%	2.40
C	荧蒽	15	4.52	0.85	18.9%	2.39	0.98	21.6%	2.73
C	芘	15	6.12	0.80	13.0%	2.23	1.19	19.4%	3.33

表 B.1 (续)

代码	多环芳烃	实验室数	平均	s_r	RSD(r)	r	s_R	RSD(R)	R
C	苯并(a)蒽	16	3.79	0.53	13.9%	1.47	0.77	20.4%	2.16
C	蒽	15	4.28	0.64	15.0%	1.80	0.97	22.6%	2.71
C	苯并(b)荧蒽	16	3.58	0.54	15.2%	1.52	1.00	27.8%	2.79
C	苯并(k)荧蒽	14	2.55	0.41	16.2%	1.16	0.46	18.1%	1.29
C	苯并(a)芘	17	3.21	0.40	12.3%	1.11	1.35	42.1%	3.78
C	二苯并(a,h)蒽	16	2.25	0.36	16.0%	1.01	1.08	48.1%	3.03
C	苯并(g,h,i)芘	16	1.86	0.32	17.1%	0.89	0.86	46.3%	2.41
C	茚并(1,2,3-c,d)芘	15	1.98	0.34	17.3%	0.96	1.01	51.2%	2.84
D	菲	18	5.48	1.77	32.3%	4.96	5.07	92.5%	14.20
D	蒽	—	—	—	—	—	—	—	—
D	荧蒽	15	0.61	0.18	29.3%	0.50	0.40	65.6%	1.12
D	芘	16	0.88	0.25	28.8%	0.71	0.61	69.0%	1.70
D	苯并(a)蒽	—	—	—	—	—	—	—	—
D	蒽	13	0.22	0.04	17.9%	0.11	0.18	81.2%	0.50
D	苯并(b)荧蒽	—	—	—	—	—	—	—	—
D	苯并(k)荧蒽	—	—	—	—	—	—	—	—
D	苯并(a)芘	—	—	—	—	—	—	—	—
D	二苯并(a,h)蒽	13	0.30	0.03	10.7%	0.09	0.37	123.8%	1.04
D	苯并(g,h,i)芘	12	0.27	0.10	35.7%	0.27	0.59	216.9%	1.64
D	茚并(1,2,3-c,d)芘	—	—	—	—	—	—	—	—
E	菲	16	14.55	1.60	11.0%	4.48	6.09	41.8%	17.04
E	蒽	15	1.08	0.24	22.2%	0.67	0.43	39.7%	1.20
E	荧蒽	15	4.10	0.48	11.6%	1.33	1.19	28.9%	3.32
E	芘	15	3.69	0.51	13.9%	1.44	1.00	27.1%	2.80
E	苯并(a)蒽	15	0.41	0.13	30.5%	0.35	0.40	97.6%	1.12
E	蒽	15	1.17	0.13	11.0%	0.36	0.43	36.6%	1.20
E	苯并(b)荧蒽	16	0.40	0.06	16.1%	0.18	0.31	77.7%	0.87
E	苯并(k)荧蒽	—	—	—	—	—	—	—	—
E	苯并(a)芘	17	0.32	0.04	11.2%	0.10	0.30	94.9%	0.85
E	二苯并(a,h)蒽	—	—	—	—	—	—	—	—
E	苯并(g,h,i)芘	—	—	—	—	—	—	—	—
E	茚并(1,2,3-c,d)芘	—	—	—	—	—	—	—	—
F	菲	16	5.03	0.76	15.2%	2.14	5.42	107.7%	15.17

表 B.1 (续)

代码	多环芳烃	实验室数	平均	s_r	RSD(r)	r	s_R	RSD(R)	R
F	蒽	13	0.27	0.06	21.2%	0.16	0.31	116.4%	0.88
F	荧蒽	13	1.63	0.36	22.1%	1.01	0.93	57.0%	2.60
F	芘	17	4.52	0.87	19.2%	2.43	4.32	95.6%	12.10
F	苯并(a)蒽	15	2.50	0.32	12.9%	0.90	2.79	111.6%	7.81
F	蒎	14	5.36	0.42	7.9%	1.18	4.86	90.7%	13.61
F	苯并(b)荧蒽	11	0.64	0.13	20.1%	0.36	0.95	149.0%	2.67
F	苯并(k)荧蒽	15	1.07	0.20	19.0%	0.57	1.15	107.8%	3.23
F	苯并(a)芘	12	0.36	0.08	21.8%	0.22	0.53	145.8%	1.47
F	二苯并(a,h)蒽	16	1.26	0.71	56.7%	2.00	1.62	128.4%	4.53
F	苯并(g,h,i)芘	14	0.78	0.18	22.9%	0.50	0.97	124.1%	2.71
F	茚并(1,2,3-c,d)芘	—	—	—	—	—	—	—	—
G	菲	14	3 192	258	8.1%	721	948	29.7%	2 653
G	蒽	14	413	58	14.1%	163	225	54.6%	631
G	荧蒽	13	966	101	10.5%	284	324	33.5%	906
G	芘	15	903	86	9.5%	240	284	31.4%	794
G	苯并(a)蒽	14	247	23	9.1%	63	134	54.2%	375
G	蒎	12	441	16	3.7%	46	160	36.3%	448
G	苯并(b)荧蒽	15	136	11	8.1%	31	43	31.3%	119
G	苯并(k)荧蒽	15	42	5	11.9%	14	12	28.1%	33
G	苯并(a)芘	15	112	13	11.5%	36	33	29.7%	93
G	二苯并(a,h)蒽	13	15	2	12.8%	5	12	79.9%	33
G	苯并(g,h,i)芘	14	68	11	16.3%	31	31	46.2%	88
G	茚并(1,2,3-c,d)芘	13	29	6	22.2%	18	31	108.4%	88
H	菲	15	3.54	0.36	10.2%	1.01	2.70	76.2%	7.55
H	蒽	15	0.87	0.15	16.8%	0.41	0.25	29.1%	0.71
H	荧蒽	13	1.10	0.13	12.0%	0.37	0.30	27.6%	0.85
H	芘	16	1.69	0.29	16.9%	0.80	0.90	53.3%	2.52
H	苯并(a)蒽	16	0.96	0.11	11.5%	0.31	0.36	37.6%	1.01
H	蒎	13	0.93	0.11	11.5%	0.30	0.23	24.2%	0.63
H	苯并(b)荧蒽	17	0.95	0.13	13.2%	0.35	0.40	42.5%	1.13
H	苯并(k)荧蒽	17	0.76	0.08	10.3%	0.22	0.38	50.3%	1.07
H	苯并(a)芘	15	0.64	0.07	10.6%	0.19	0.16	25.7%	0.46
H	二苯并(a,h)蒽	17	0.50	0.08	15.7%	0.22	0.27	53.6%	0.75

表 B.1 (续)

代码	多环芳烃	实验室数	平均	s_r	RSD(r)	r	s_R	RSD(R)	R
H	苯并(<i>g,h,i</i>)芘	16	0.53	0.11	21.6%	0.32	0.38	70.8%	1.05
H	茚并(1,2,3- <i>c,d</i>)芘	—	—	—	—	—	—	—	—

样品 A:加入中等浓度(约 50 $\mu\text{g/kg}$)多环芳烃混合标准品的精炼椰子油。

样品 B:加入高浓度(约 100 $\mu\text{g/kg}$)多环芳烃混合标准品的初榨橄榄油。

样品 C:加入低浓度(约 5 $\mu\text{g/kg}$)多环芳烃混合标准品的精炼葵花籽油。

样品 D:精炼葡萄籽油,未加标。

样品 E:初榨橄榄油,未加标。

样品 F:精炼橄榄果渣油,未加标。

样品 G:橄榄果渣油粗油,未加标。

样品 H:加入低浓度(约 1 $\mu\text{g/kg}$)多环芳烃混合标准品的精炼葵花籽油。

实验室数:筛选后的实验室个数。

平均:平均值($\mu\text{g/kg}$ 样品)。

s_r :重复性标准偏差($\mu\text{g/kg}$)。

s_R :重现性标准偏差($\mu\text{g/kg}$)。

RSD(r):重复性相对标准偏差(%)。

RSD(R):重现性相对标准偏差(%)。

r :重复性限度($2.8 \times s_r$)。

R :再现性限度($2.8 \times s_R$)。

—:超过 50%的原始数据低于定量限,故结果不计入。

参 考 文 献

- [1] GB/T 5524—2008 动植物油脂 扦样(GB/T 5524—2008,ISO 5555:2001,IDT).
 - [2] ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 1:General principles and definitions.
 - [3] ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results—Part 2:Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
-