

# 不同油茶籽油提取工艺中苯并( $\alpha$ )芘形成的溯源

肖苏尧, 车科, 陈雪香, 黄奕诚, 苗建银, 管晓盛, 庄雪影, 曹庸

(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

**摘要:** 不同提取工艺油茶籽油中苯并( $\alpha$ )芘含量有较大差异, 本文利用 HPLC 追踪检测不同提取工艺中各工序茶油中苯并芘的含量变化情况, 结果表明: 溶剂浸出法中, 苯并芘主要来源于毛油在脱除溶剂过程中的两次蒸发, 最高达 2.54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 压榨法中, 苯并芘主要来源于原料蒸炒, 最高达 26.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。随着后续精炼工序的进行, 以上两种工艺中的苯并芘含量都不断减少, 其中脱色工序能够去除大部分苯并芘。亚临界萃取茶油中未检出苯并芘。本研究为茶油生产过程中降低苯并芘提供关键控制点, 并为选择最佳工艺提供理论依据。

**关键词:** 油茶籽油; 提取工艺; 亚临界流体; 苯并( $\alpha$ )芘; 溯源

文章编号: 1673-9078(2012)2-156-159

## Tracing of Benzopyrene in *Camellia Oleifera* Oil made by different Extraction Methods

XIAO Su-yao, CHE Ke, CHEN Xue-xiang, HUANG Yi-cheng

MIAO Jian-yin, GUAN Xiao-shen, ZHUANG Xue-ying, CAO Yong

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** HPLC was employed to detect benzo( $\alpha$ )pyrene content in *Camellia oleifera* oil in different step of several extraction processes. Benzo( $\alpha$ )pyrene came mainly from the dual evaporation of solvent in solvent extraction method and was up to 2.54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In the oil made by pressing method, the main source of Benzo( $\alpha$ )pyrene was roasting step. The highest amount was 26.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The benzo( $\alpha$ )pyrene content decreased in the following refining process in both solvent extraction and pressing methods. Most of benzo( $\alpha$ )pyrene could be removed in the decolorization step. No benzo( $\alpha$ )pyrene was found in camellia oleifera oil extracted with hypcritical extraction method.

**Key words:** camellia oleifera; extraction process; subcritical liquid extraction; benzo( $\alpha$ )pyrene (BaP); tracing

苯并( $\alpha$ )芘是一类来源于有机物高温加热、不完全燃烧的多环芳烃<sup>[1]</sup>, 是一种高活性致癌物<sup>[2,3]</sup>, 因而在食品中的含量受到严格控制。我国发生的食用油茶籽油中苯并( $\alpha$ )芘事件, 使得全社会对食品中苯并( $\alpha$ )芘含量更加重视, 要求更加严格。据研究发现, 茶油中苯并( $\alpha$ )芘主要来源于提取与精炼工艺中可燃性有机物的不完全燃烧<sup>[4]</sup>。为了提高出油率, 传统的茶油工艺中, 在压榨前必须将粉碎后的茶籽进行蒸炒, 使蛋白质与油脂充分分离, 在蒸炒过程中, 一旦温度过高, 烧焦的茶籽中的脂类、胆固醇、蛋白质、碳水化合物等就会发生热解, 并形成大量苯并芘, 尤其是蛋白质、脂肪在不完全燃烧下极易产生以苯并芘为主的多种致癌物质<sup>[5,6]</sup>。目前根据欧盟标准规定, 食用油中苯并( $\alpha$ )芘含量的上限为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 苯并( $\alpha$ )芘含量控制已成为油茶产业发展的一大关键技术, 因此对茶油加工工艺的

收稿日期: 2011-09-15

基金项目: 国家林业局 948 项目 (2009-4-67)

作者简介: 肖苏尧 (1974-), 女, 博士, 讲师, 主要从事天然活性物质研究

研究、改善成为一大热潮。

目前主要从两个方面控制茶油中苯并( $\alpha$ )芘含量: 一方面开发研究新型提取技术, 另一方面, 对于传统工艺, 通过精制减少苯并( $\alpha$ )芘含量。在茶油提取方面的新技术主要有超临界流体萃取技术和亚临界流体技术, 利用临界和亚临界流体具有对脂溶性物质的溶解度大、高效、清洁等特点, 广泛应用于食品、医药等领域。超临界流体萃取茶油, 可简化精炼工序, 提高茶油质量, 增加营养价值, 但是该技术对设备的要求高, 成本大, 不太适合工业化生产。亚临界流体萃取技术在国内外已经开展了研究, 特别是国外, 近十年以来, 无论在技术上, 还是在基础理论的研究上都取得了很大进展, 该技术逐步被应用于天然产物及食品的萃取中, 在主要应用领域-食品和农业方面的应用比例高达 35~40%。本课题组采用亚临界流体技术进行茶油萃取, 提高了提取率, 并获得高品质茶油。传统工艺的精制过程较多, 每经历一个精制步骤, 苯并( $\alpha$ )芘含量都会发生变化, 因此对精制各步骤中苯并( $\alpha$ )

芘含量变化情况进行监测,有利于控制精制过程。基于上述情况,本文通过对亚临界流体萃取和传统工艺的各个环节中苯并( $\alpha$ )芘含量进行检测,研究苯并( $\alpha$ )芘的形成和消除环节,对苯并( $\alpha$ )芘进行溯源,为茶油加工的质量控制关键点提供依据。

## 1 材料试剂与方法

### 1.1 主要材料与试剂

茶油毛油、压榨油等,广东泰源农科有限公司;超临界茶油、亚临界茶油,华南农业大学珠江桥分离纯化实验室;无水硫酸钠、中性氧化铝,国药集团化学试剂有限公司;四氢呋喃、乙腈、甲醇,美国 fisher 公司;石油醚(30~60℃)、丙酮、蒸馏水,以上均为分析纯;苯并芘标准品,广州市计量技术监督局提供。

### 1.2 主要仪器与设备

DHG-9070 型鼓风干燥箱,上海齐欣科学仪器有限公司;RF-201D 旋转蒸发器,巩义市予华仪器有限公司;SHZ-D3 真空泵,巩义市予华仪器有限公司;KQ-500B 型超声清洗器,昆山市超声波仪器有限公司;600 型数显恒温水浴箱,维城试验器材有限公司;XW-80A 漩涡混合器,上海精科实业有限公司;LC-10ATVP plus 高效液相色谱仪,岛津国际贸易有限公司;Diamondsil C18 色谱柱,200×4.6 mm, 5  $\mu$ m, 迪马公司;AL 104 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司;MMLTIVAP 系列氮吹仪,美国 Organomation 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 不同工艺流程提取油茶籽油

使用传统油提取茶籽油的浸出和压榨工艺,以及新型亚临界流体萃取工艺,对油茶籽油进行提取,获得各个环节的油茶籽油,以对各个环节的油中苯并( $\alpha$ )芘含量进行检测。

##### 1.3.1.1 浸出工艺步骤

油茶籽仁→粉碎→溶剂萃取→初油过滤→初油沉降→第一次蒸发→第二次蒸发→毛油→脱胶→脱酸→脱色→脱臭→冬化→成品茶油

##### 1.3.1.2 压榨工艺步骤

油茶籽仁→粉碎→蒸炒→压榨→毛油沉降→过滤→毛油→脱胶→脱色→冬化→成品

##### 1.3.1.3 亚临界流体萃取步骤

油茶籽仁→粉碎→亚临界萃取→成品

### 1.3.2 样品净化

用玻璃烧杯称取约 0.4 g 茶油,用 2 mL 石油醚溶解稀释。向带聚四氟乙烯的层析柱中加入一半高度的石油醚。快速称取 22 g 减活氧化铝于小烧杯中,立即

转移到层析柱中,使其均匀沉淀。再转入约 8.5 g 无水硫酸钠。向层析柱中加入样品溶液,用石油醚清洗内壁。向层析柱中加入 80 mL 石油醚洗脱,流速为 1 mL/min,洗脱液与 65℃ 的水浴中旋转蒸发至 0.5 mL~1.0 mL,用氮气吹至近干,用 100  $\mu$ L 丙酮溶解,漩涡混合。过膜, HPLC 分析。

### 1.3.3 标准曲线绘制

准确称取 942.0 mg (精确至 0.1 mg),用丙酮溶解、定容至 1 L。将此标准工作液稀释为五种不同浓度的溶液,浓度梯度分别为, 1.88  $\mu$ g/L、4.71  $\mu$ g/L、9.42  $\mu$ g/L、14.13  $\mu$ g/L、18.84  $\mu$ g/L、28.26  $\mu$ g/L。根据积分面积与标准工作液浓度绘制标准曲线。

### 1.3.4 液相检测条件

迪马 (ODS) C18 柱: 5  $\mu$ m, 4.6 mm×250 mm; 流动相: 乙腈+水 (88:12); 激发波长: 384 nm, 发射波长: 406 nm。

## 2 结果分析

### 2.1 苯并芘标准曲线

茶油中苯并芘的测定采用反相高效液相色谱法 (HPLC), 此方法能够快速准确测定茶油样品中的苯并芘含量。苯并芘标准曲线如下:

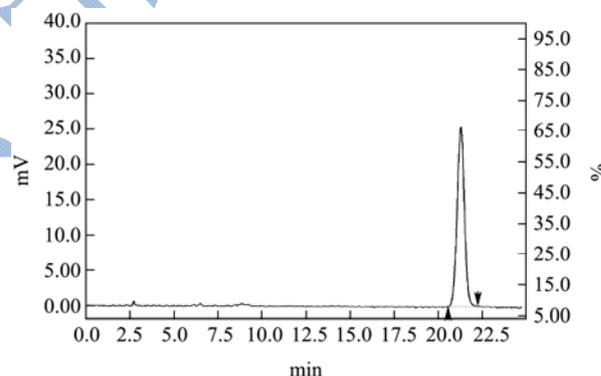


图1 苯并芘标准品色谱图 (14.13  $\mu$ g/kg)

Fig.1 HPLC chromatogram of standard benzo( $\alpha$ )pyrene (14.13 $\mu$ g/kg)

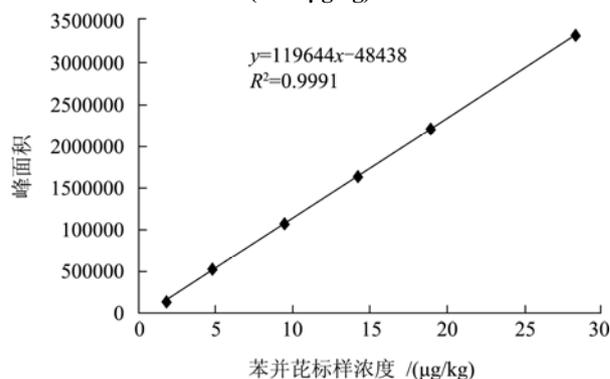


图2 苯并芘标准曲线

Fig.2 Standard curves of benzo( $\alpha$ )pyrene

苯并芘的标准曲线如图2, 建立线性回归方程为:  $y=119644x-48384$  (线性相关数:  $R^2=0.9991$ ; 其中:  $x$ : 苯并芘标准液的浓度;  $y$ : 苯并芘的液相峰面积)。

### 2.2 苯并芘检测回收率的测定

用玻璃烧杯称取约 0.4 g 茶油, 用 2 mL 石油醚溶解稀释, 向烧杯中加入 14.13  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的苯并芘标准溶液 0.2 mL, 混合均匀。向带聚四氟乙烯的层析柱中加入一半高度的石油醚。快速称取 22 g 减活中性氧化铝于小烧杯中, 立即转移到层析柱中, 使其均匀沉淀。再转入约 8.5 g 无水硫酸钠。向层析柱中加入样品溶液, 用石油醚清洗内壁。向层析柱中加入 80 mL 石油醚洗脱, 流速为 1 mL/min, 洗脱液与 65  $^{\circ}\text{C}$  的水浴中旋转蒸发至 0.5 mL~1.0 mL, 用氮气吹至近干, 用 100  $\mu\text{L}$  丙酮溶解, 漩涡混合。过膜, HPLC 分析。加标样品经过处理后的回收率在 85%~110%之间, 相对标准偏差 RSD 均小于 10%, 稳定性良好。

表 1 苯并芘回收率验证

Table 1 Spike recovery rates of benzo( $\alpha$ )pyrene

样品编号	加入量/ $\mu\text{g}$	实测量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
1	2.826	2.624	92.85		
2	2.826	2.522	89.24	92.03	5.19
3	2.826	2.656	93.98		

### 2.3 不同工艺苯并芘含量检测

以对照品中苯并芘保留时间定性, 采用标准曲线法对样品中苯并芘含量进行计算。

#### 2.3.1 浸出工艺

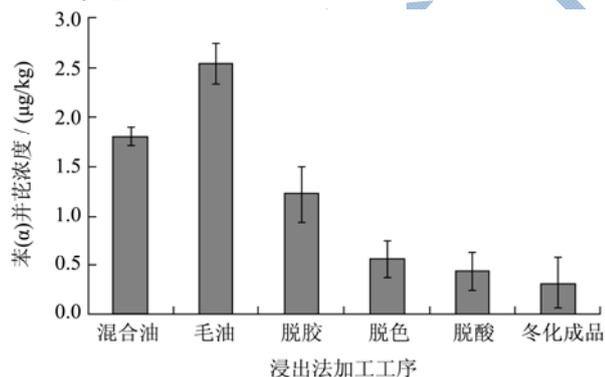


图3 浸出工艺中苯并芘含量的变化

Fig.3 The content diversification of benzo( $\alpha$ )pyrene in *Camellia oleifera* oil by solvent extraction

注: 混合油为浸出过滤后茶油, 毛油为脱除溶剂后茶油。

溶剂法也称溶剂浸出法, 其制油的依据是相似相溶的萃取原理。利用油脂与所选定溶剂(符合国家相关标准的溶剂, 主要为四号溶剂或者六号溶剂)的互溶性质。目前植物油脂的提取方法主要是采用溶剂浸出法, 溶剂法制油是当前衡量一个国家和地区油脂制

取工业发展水平的标准, 通常发达国家溶剂法制油所占比例均在 90%以上, 即实现了“浸出化”。

浸出法中需要一个脱溶剂工序, 在毛油和混合油之间必须经过两次蒸发来达到油与溶剂分离的目的。从图3可以看出, 混合油苯并芘含量大幅上升, 达到 2.54  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 为整个工序中的最大值。随着化学精炼过程的进行, 苯并芘含量稳步下降, 其中脱胶与脱色工序对苯并芘含量的减少起到了关键作用, 脱色后苯并芘含量约为 0.56  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 后续的脱酸和冬化对其含量影响变化不大。因此, 在浸出工艺中, 苯并芘产生的主要来源为溶剂与油分离过程中的两次加热, 精炼工序中的脱胶和脱色对其含量减少有着关键作用。

#### 2.3.2 压榨工艺

压榨法是借助机械外力的作用, 将油脂从油料中挤压出来的提取方法, 是目前国内植物油脂提取的主要方法。目前在我国, 压榨法依然是茶油生产的首选工艺。传统茶油压榨工艺中, 茶籽饼在蒸炒过程中, 局部受热不均匀, 蛋白质易与脂肪容易发生复杂的化学反应, 生成强致癌物-苯并芘。据最新报道, 市售部分茶油中苯并芘含量远远超过国标 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 严重阻碍了茶油品质的提高。

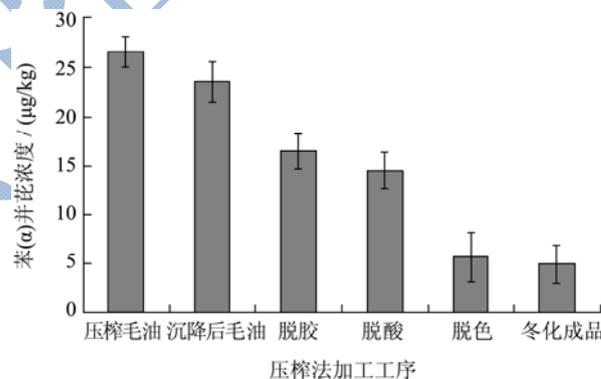


图4 压榨工艺中苯并芘含量的变化

Fig.4 The changes of benzo( $\alpha$ )pyrene contents in squeezing *Camellia oleifera* oil

注: 压榨毛油为压榨过滤后茶油, 沉降后毛油为沉降去除物理性杂质后茶油。

压榨工艺中需要对原料进行蒸炒, 目的是使茶籽种的蛋白质变性, 使其与脂肪分离, 提高出油率。而在实际生产中, 蒸炒过程中的温度是很不易控制的, 导致茶籽原料局部受热, 蛋白质和脂肪发生化学反应, 生成了一些对人体有害的脂溶性的物质, 例如苯并芘。从图4可以看出, 压榨毛油中苯并芘含量最高, 达到 26.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 约为国标的三倍 (国标 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 为整个工序中的最大值。经过简单的物理沉降后, 毛油中的苯并芘含量有所下降, 下降约为 11.32%。在后续工艺中, 随着化学精炼过程的进行, 苯并芘含量稳步下

降,其中脱胶与脱色工序对苯并芘含量的减少起到了关键作用,脱色后苯并芘含量约为 5.69  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,后续的脱酸和冬化对其含量影响变化不大。因此,在压榨工艺中,苯并芘的产生的主要来源为茶籽原料蒸炒过程中的受热不均,精炼工序中的脱胶和脱色对其含量减少有着关键作用。

### 2.3.3 亚临界萃取工艺

亚临界萃取技术在国内外已经开展了研究,特别是国外,1999年到2000年,亚临界流体技术在食品和农业方面的应用比例高达32%,且无论在技术上,还是在基础理论的研究上都取得了很大进展。2001年,Gnayfeed等采用亚临界萃取技术,从蔬菜中分离得到植物油-甘油三酯。2002年美国的WatarMiki等利用亚临界水萃取进行精油的生产,并申请了专利。2007年,美国的Jerry W. King等采用亚临界萃取技术,从果蔬中分离得到多酚类物质,可应用到实际生产中。2007年,Samer Hamdan等采用亚临界萃取技术,快速有效分离得到高品质的豆蔻油。亚临界流体萃取设备的研究在国外的发展也更加完善。但国内有关该技术在油脂的研究方面起步较晚,有关的应用研究鲜见报道。

油茶籽的亚临界萃取原理为相似相溶,萃取温度约为 40  $^{\circ}\text{C}$  左右,油茶籽在一个比较温和的条件下与萃取溶剂相互作用,相似相溶。在整个萃取过程中,该工艺很好的避免浸出和压榨工艺中的热处理。从图5可以看出,亚临界茶油中的苯并芘未检出。

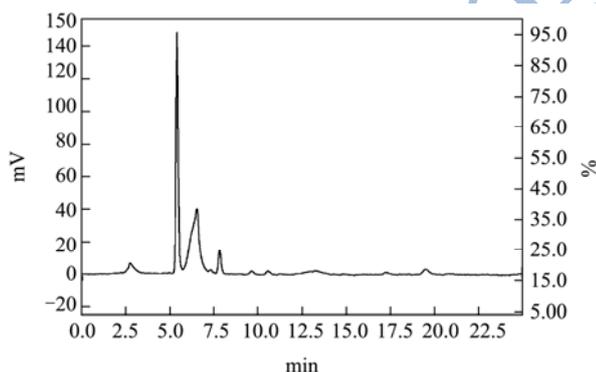


图5 亚临界茶油液相色谱图

Fig.5 HPLC chromatogram of *Camellia oleifera* oil by subcritical liquid extraction

## 3 讨论

### 3.1 油脂中苯并芘的含量变化分析

苯并芘是一种间接强致癌物,主要通过呼吸道进入机体,改变机体的DNA组成,使其不能正常复制与修复。据研究发现,茶油中苯并芘主要来源于提取与精炼工艺中,温度过高引起的高分子蛋白质裂成的

低分子氨基酸与植物油脂的热聚合反应,在后续的精炼工序中,脂溶性的苯并芘由于与某些吸附剂发生物理吸附,导致其含量有所降低。

### 3.2 苯并芘检测方法比较

国内外已报道的检测苯并芘的方法大多集中在大气、水体及加工食品上,检测对象不同,富集、提取方式各异,常用使用的分析方法有荧光分光光度法、气相色谱法、气相色谱-质谱法、高效液相色谱荧光法<sup>[7]</sup>。其中,气相色谱法需要气化和较高的柱温、柱压,从而引起苯并芘构型发生变化,为定性和定量测定带来很大困难;高效液相荧光法具有样品预处理简单,毒性小,灵敏度高,分析时间短等优点,是较常用的方法<sup>[8]</sup>。目前,我国检测食品中苯并芘的国标测定方法(GB/T5009.27-2003)中存在着操作复杂、溶剂毒性大、费时、准确度低等问题,如何寻求准确、快速、简便的检测方法,对食品中苯并芘残留进行高效的定性定量分析具有重要意义。本试验对现有国标进行改良,缩短了样品处理时间,提高了回收率,适用植物油中苯并芘的快速检测。

### 3.3 不同工艺中苯并芘溯源分析

目前工业化的茶油提取工艺主要有溶剂浸出法和压榨法。浸出法主要利用的是溶剂与目的物相似相溶,在精炼之前必须通过两次蒸发将油脂与溶剂进行分离。从图3中可知,浸出工艺的苯并芘主要产生在两次蒸发中,其混合油的苯并芘含量最高,与压榨工艺相比,浸出油的苯并芘含量较少,主要原因在于两者反应底物含量上存在差异,压榨油形成苯并芘时,底物浓度大,而浸出油中,底物浓度,尤其是蛋白质的量相对较少。压榨法中,为了提高出油率,粉碎后的茶籽必须经过蒸炒,以达到蛋白质、脂肪分离的目的。在蒸炒中,由于原料之间颗粒度、水分等差异,导致了受热不均匀,部分区域温度过高,导致蛋白质与脂肪发生热聚反应,生成具有致癌毒性的多环芳香烃,其中以苯并芘为主。从图4可知,压榨工艺中的苯并芘主要产生在压榨工序中,其毛油的苯并芘含量最高,达 26.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。随着化学精炼的进行,压榨茶油中的苯并芘含量一直处于一种下降的趋势,其原因主要为,目前茶油的化学精炼的关键步骤为活性炭脱色,脂溶性的苯并芘会被活性炭吸附一部分,但吸附量有限,所以压榨法制得的茶油无法完全去除苯并芘。

以上两种工艺为目前茶油生产的主要工艺,一般情况下,压榨后的茶枯再进行溶剂进行浸出。其中,压榨法茶油苯并芘含量远高于浸出法茶油,尽管通过后续精炼两者都可以达到国家标准,但是造成了过多资源损耗。亚临界萃取是在低温、真空的环境下进行的,

相比前两种方法,避免了蛋白质与脂肪的热聚反应,苯并(a)芘未检出。

#### 4 结论

4.1 本文建立了茶油中苯并芘的高效液相检测法,通过外标法进行定性定量分析,平均回收率为 92.03%,加标样品经过处理后的回收率稳定在 85%~110%之间,相对标准偏差 RSD 均小于 10%,稳定性良好。

4.2 在浸出工艺中,苯并芘的产生的主要来源为溶剂与油分离工程中的两次加热,精炼工序中的脱胶和脱色对其含量减少有着关键作用,经过这两道工序后,苯并芘含量可以减低 78.12%,完全达到国家标准。

4.3 在压榨工艺中,苯并芘的产生的主要来源为茶籽原料蒸炒过程中的受热不均,精炼工序中的脱胶和脱色对其含量减少起了一定的作用,但经过脱胶、脱色后的茶油苯并芘含量仍然有 5.69  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在这种工艺中,为了达到国家标准,脱胶和脱色工序必须严格控制。

4.4 在亚临界萃取工艺中,茶油中苯并芘未检出。

#### 参考文献

- [1] 冉飞亚.环境中苯并(a)芘的研究进展[J].上海环境科学,2010,29(2):82-85
- [2] Stephen A. Lesko. Chemical carcinogenesis: benzopyrene system [J]. Methods in enzymology, 1984, 105: 539-550
- [3] Bekim Sadikovic, David I. Rodenhiser. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 216(3): 458-468
- [4] 王丹,曹维强,王静.食品安全隐患-苯并(a)芘的研究进展[J].食品研究与开发,2006,127(1):133
- [5] 吴丹.食品中苯并芘污染的危害性及其预防措施[J].食品工业科技,2008,29(5):310-311
- [6] 王竹天.食品中苯并(a)芘的测定[M].北京:中国标准出版社,2004
- [7] 洗燕萍,郭新东,黄金凤,等.高效液相色谱-荧光法测定茶叶中苯并(a)芘残留量的研究[J].现代食品科技,2007,24(3): 281-283
- [8] 王广会,许喜林,郭海英.高效液相色谱法测定芝麻油中的苯并(a)芘含量[J].现代食品科技,2011,27(12):1545-1547