

# GC-MS/MS法检测山茶油中的苯并[ $\alpha$ ]芘

李晨悦<sup>1, 2</sup>, 周金林<sup>3</sup>, 黄金凤<sup>4</sup>, 蔡玮红<sup>4</sup>, 吴玉奎<sup>4</sup>, 卢宇靖<sup>1</sup>

(1. 广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006) (2. 完美(中国)有限公司, 广东中山 528402)

(3. 佛山市金骏康健康科技有限公司, 广东佛山 528000) (4. 广州市质量监督检测研究院, 广东广州 510110)

**摘要:** 建立了山茶油中苯并[ $\alpha$ ]芘含量的液液萃取-气相色谱-三重串联四极杆质谱(GC-MS/MS)的检测方法。样品称量后加入苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ 同位素内标, 采用乙腈提取两次提取, 正己烷脱脂净化后, 气相色谱-三重串联四极杆质谱分析。采用DB 5-MS毛细管柱分离, 串联四级杆质谱多反应监测模式检测, 内标法定量。在优化实验条件下, 苯并[ $\alpha$ ]芘的峰面积与其浓度在0.50  $\mu\text{g/L}$ ~100  $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 线性回归系数为0.9994, 方法的检出限(LODs)为0.25  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限(LOQs)为0.50  $\mu\text{g/kg}$ , 在加标水平为0.50、1.00、5.00  $\mu\text{g/kg}$ 时, 山茶油样品中苯并[ $\alpha$ ]芘的平均回收率在92.51~103.70%之间, 日内分析的相对标准偏差(RSD,  $n=6$ )为3.84~5.80%, 日间回收率为94.71~110.83%, 相对偏差为5.22~8.92% ( $n=5$ )。该方法具有前处理简单、定量准确、灵敏度高的特点, 适用于山茶油中苯并[ $\alpha$ ]芘的快速确认和准确定量。

**关键词:** 苯并[ $\alpha$ ]芘; 同位素内标法; 山茶油; 气相色谱-三重串联四极杆质谱

文章编号: 1673-9078(2013)7-1702-1705

## Determination of Benzo[ $\alpha$ ]pyrene in Camellia Oil by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry

LI Chen-yue<sup>1,2</sup>, ZHOU Jin-lin<sup>3</sup>, HUANG Jin-feng<sup>4</sup>, CAI Wei-hong<sup>4</sup>, WU Yu-luan<sup>4</sup>, LU Yi-jing<sup>1</sup>,

(1.School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China) (2.PERFECT (CHINA) CO., LTD., Zhongshan 528402, China) (3.FOSHAN JIN JUN KANG HEALTH TECHNOLOGY CO., LTD., Foshan 528000, China) (4.Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute Guangzhou 510110, China)

**Abstract:** A method was developed for the determining of benzo[ $\alpha$ ]pyrene in camellia oil by gas chromatography by tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with liquid-liquid extraction. After spiked with the isotopic labeled benzo[ $\alpha$ ]pyrene -  $d_{12}$ , the sample was extracted twice with acetonitrile, and then defatted by n-hexane to obtain an extract suitable for analysis using GC-MS/MS. The targeted compound was separated by a DB 5-MS column detected by GC-MS/MS system under the mode of multiple reaction monitoring (MRM). The internal standard was used for quantitative analysis. Under the optional conditions, the linear range was between 0.50  $\mu\text{g/L}$  and 100  $\mu\text{g/L}$  with the linear correlation coefficients of 0.9994. The detection limit of the method (LOD) was 0.25  $\mu\text{g/kg}$  and the quantitation limit of the method (LOQ) was 0.5  $\mu\text{g/kg}$ . The mean recoveries for camellia oil at three spiked concentrations levels of 0.50, 1.00, 5.00  $\mu\text{g/kg}$  were ranged from 92.51% to 103.70%, respectively, with relative standard deviations (RSDs,  $n=6$ ) 3.84~5.80%. The inter-recoveries were ranged from 94.71% - 110.83% and the precision was ranged from 5.22% to 8.92% ( $n=5$ ). This method was suitable for the identification and quantification of benzo[ $\alpha$ ]pyrene in camellia oil due to its simplicity, accuracy and high sensitivity.

**Key words:** benzo[ $\alpha$ ]pyrene; isotopic labeled internal standard; camellia oil; GC-MS/MS

苯并[ $\alpha$ ]芘 (Benzo[ $\alpha$ ]pyrene, BaP) 是一种含 5 个环的多环芳烃 (结构式见图 1), 是一种常见的高活性间接致癌物<sup>[1]</sup>, 被欧盟食品科学委员会 (SCF) 推荐

收稿日期 2013-04-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (S2011040004201)

作者简介: 李晨悦 (1962-), 男, 工程师, 研究方向为食品工程及质量检测  
通讯作者: 卢宇靖 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为化学与生物分析检测技术

作为评价PAHs致癌性的标记物<sup>[2]</sup>。山茶油中苯并[ $\alpha$ ]芘的来源主要包括油料种子的烟熏干燥, 在植物生长过程中的吸收和富集工业废气与交通运输工具尾气污染的颗粒物, 以及加工过程中的热处理或溶剂提取等环节<sup>[3-4]</sup>。欧盟Regulation (EC) No 208/2005推荐食用油中的苯并[ $\alpha$ ]芘限量为 2  $\mu\text{g/kg}$ , 我国国家标准 GB 2762-2012规定食用油中苯并[ $\alpha$ ]芘的限量为10  $\mu\text{g/kg}$ 。

山茶油中干扰苯并[ $\alpha$ ]芘检测的物质主要为甘油三

酯、类固醇和游离脂肪酸等脂溶性化合物,文献报道的主要采用溶剂萃取<sup>[5]</sup>、固相萃取<sup>[2-3,6-7]</sup>、凝胶色谱<sup>[2,8-9]</sup>或基质固相分散<sup>[10]</sup>等净化方法去除植物油基质中的干扰物质,这些方法需要的检测周期长,且需要使用大量的有机溶剂。

目前,苯并[ $\alpha$ ]芘的仪器检测方法主要有液相色谱-荧光法(LC-FLD)<sup>[6,10]</sup>、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)<sup>[8-9]</sup>和液相色谱串联三重四极杆质谱法(LC-MS/MS,需配APPI源)<sup>[11]</sup>等。但是LC-FLD法不能定性;GC-MS法以电子轰击离子源(EI源)使苯并[ $\alpha$ ]芘离子化,以选择离子扫描模式(SIM)检测目标碎片,但单级质谱易受样品基质干扰,基质碎片托高基线而影响灵敏度和定量的准确性;LC-MS/MS法的多反应监测模式(MRM)有较高的选择性,可以有效降低杂质干扰,灵敏度高、定量准确,但是LC-MS/MS法需使用APPI源才能电离苯并[ $\alpha$ ]芘,应用受限。气相色谱串联三重四极杆质谱法(GC-MS/MS)兼顾了GC-MS法和LC-MS/MS法的优点,EI源离子化,以MRM模式检测,可以实现复杂食品基质中痕量苯并[ $\alpha$ ]芘的检测和确证分析<sup>[12]</sup>。本文采用同位素内标法,样品经过简单的提取和净化,建立了快速、准确、灵敏的山茶油中苯并[ $\alpha$ ]芘的GC-MS/MS检测方法。

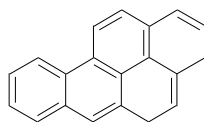


图1 苯并[ $\alpha$ ]芘的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of benzo[ $\alpha$ ]pyrene

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 主要仪器和试剂

TSQ Quantum GC 气相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国Thermo公司),配置EI源;涡旋混匀器(德国IKA公司);离心机(德国Eppendorf公司);旋转蒸发器(瑞士Buchi公司)。

苯并[ $\alpha$ ]芘( $\geq 98\%$ )和苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ ( $\geq 98\%$ )(美国Sigma aldrich公司);乙腈、正己烷、苯(色谱纯,美国Fisher公司);乙腈饱和正己烷:在试剂瓶中加入1/5的乙腈和4/5的正己烷,振摇混合均匀,静置分层,上层即为乙腈饱和的正己烷。山茶油样品均购于本地

市场。

### 1.2 标准溶液的配制

苯并[ $\alpha$ ]芘和苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ 内标用甲苯配成浓度为100 mg/L单标标准储备液;分别吸取适量的单标储备液,用正己烷稀释成浓度为1 mg/L的标准使用液和0.5 mg/L的苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ 内标溶液,均置于4℃恒温保存。临用前,用正己烷溶液稀释成所需浓度的标准系列工作溶液,并均含10  $\mu$ g/L的苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ 内标。

### 1.3 样品处理

准确称取均匀混合的样品1.00 g于高速离心管中,加入20  $\mu$ L 500  $\mu$ g/L的内标使用溶液和10 mL正己烷,混匀,加入15 mL乙腈,涡旋振荡10 min,于-10℃下15000 r/min离心5 min,取出下层乙腈至另一离心管中,加入15 mL乙腈重复萃取一次,合并两次萃取液,加入10 mL乙腈饱和正己烷,混匀后离心,取出下层乙腈至鸡心瓶,45℃水浴旋转蒸发至干,加入正己烷溶解残留物并定容至1.0 mL,经0.22  $\mu$ m滤膜过滤后上机测定。

### 1.4 实验条件

#### 1.4.1 色谱条件

色谱柱,DB 5-MS毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm i.d $\times$ 0.25  $\mu$ m df);分流/不分流进样口温度,270℃;不分流进样,1.5 min后打开分流阀;色谱柱为程序升温,起始100℃保持1 min,然后以20℃/min升温至260℃,保持5 min,再以15℃/min升温至280℃,保持5 min;载气为高纯氦气(纯度 $\geq 99.999\%$ );流速为1.0 mL/min,恒流;进样量:1  $\mu$ L。

#### 1.4.2 质谱条件

传输线温度为280℃;碰撞气为氩气,压力为1 Torr;离子源为Close EI源,正离子模式;离子源温度为250℃;发射电流为25  $\mu$ A;溶剂延迟时间为11.0 min;扫描方式:多反应离子监测模式(MRM);采用“EZ Method”设定方法,在“Start time”设定为“11.0 min”,在“End time”设定为“14.0 min”;苯并[ $\alpha$ ]芘和苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ 的母离子、子离子、碰撞能量及保留时间见表1。

表1 苯并[ $\alpha$ ]芘的质谱分析条件

Table 1 MS parameters for the analysis of benzo[ $\alpha$ ]pyrene

Analysts	Retention	Quantitative ion	Qualitative	Collision
	Time/min	pair m/z	ion pair m/z	energy E/V
Benzo[ $\alpha$ ]pyrene	12.59	252/250	252/224	30, 40
Benzo[ $\alpha$ ]pyrene-d12	12.49	264/262	/	30

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理条件的优化

根据液液萃取的原理,选择非脂溶性有机溶剂乙腈作为萃取剂,达到既可以提取出痕量的苯并[ $\alpha$ ]芘,又有利于减少共萃取脂溶性杂质的目的。但是,苯并[ $\alpha$ ]芘在油基中的溶解度较大,且山茶油样品粘度大,直接用乙腈萃取的效果不好,加入正己烷作为稀释剂后,通过高速涡旋振荡,使两相有效分散,增大相界接触面积,有利于充分萃取。同时,根据分配系数的定义(即指平衡时被萃取组分在两相中的浓度比,是一常数),每次使用多于被萃相体积的乙腈进行2次萃取,有效提高了萃取效率。

由于正己烷与乙腈有微弱的互溶性,在液液萃取过程中也会有少量的脂溶性杂质被分配到乙腈相,本实验采用乙腈饱和的正己烷通过液液萃取除脂净化,既可避免在液液分配时造成乙腈提取液中目标物的损失,又可除去杂质。在离心分层时,离心机的温度设置在 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,不仅可以降低油脂在乙腈中的溶解度,还可以促进正己烷和乙腈的分层,提高净化效果。为保证方法的灵敏度,需要对 $30\text{ mL}$ 的乙腈萃取液进行浓缩,鉴于乙腈沸点较高( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ),旋转蒸发比氮吹浓缩更节省时间,本实验采用旋转蒸发浓缩。实验发现,旋转蒸发时温度过高或时间过长均会有苯并[ $\alpha$ ]芘损失,经优化,控制浓缩温度在 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,浓缩时间在 $15\text{ min}$ 为宜。

### 2.2 仪器条件的优化

本实验选用多环芳烃检测最常用的DB-5MS弹性石英毛细管柱,由于苯并[ $\alpha$ ]芘的沸点较高,选择较高的进样口温度,可以降低化合物在衬管表面上的吸附,提高响应值和稳定性。实验针对苯并[ $\alpha$ ]芘的色谱峰形、样品基质干扰等情况进行了升温程序的优化,发现升温过慢时存在歧视效应,色谱峰展宽、拖尾,响应降低,升温过快则样品基质效应较明显。经比较,在本文的色谱条件下,苯并[ $\alpha$ ]芘的峰形良好、响应较高,基质效应较少。

GC-MS/MS在SRM检测模式下具有很好的选择性和专属性,已应用于农残等检测分析<sup>[12-13]</sup>。在优化过程中,首先用标准溶液进行全扫描分析,获得目标物的保留时间和一级质谱图,选择其中丰度比较高的母离子做子离子扫描,得到二级质谱。由于多环芳烃的结构非常稳定,必须使用较高的碰撞能量才能进行有效的碎裂,苯并[ $\alpha$ ]芘在 $30\text{ V}$ 碰撞能下获得的质谱碎片如图2所示, $m/z252$ 为母离子,选择经二级裂解后的主要碎片 $m/z250$ 和 $m/z224$ 为子离子。优化各个子离子碎片的碰撞能,使其响应值最高,以丰度最高的 $m/z252>250$ 作为定量离子对。经优化后,确定苯并[ $\alpha$ ]芘的SRM质谱条件(母离子-子离子-碰撞能量)见表1,在该条件下,苯并[ $\alpha$ ]芘和苯并[ $\alpha$ ]芘- $d_{12}$ 的SRM质谱图见图3。

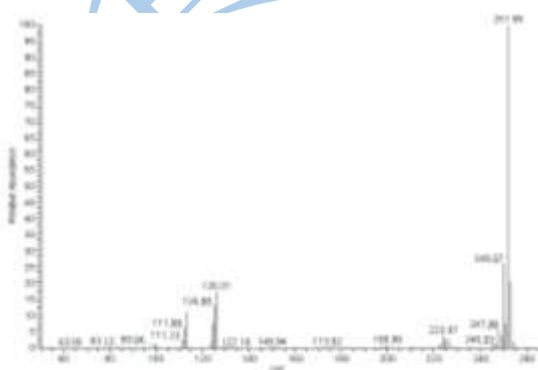
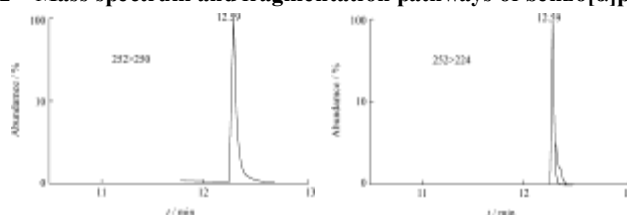


图2 苯并[ $\alpha$ ]芘的子离子二级全扫描质谱图 (CE=30 V)

Fig.2 Mass spectrum and fragmentation pathways of benzo[ $\alpha$ ]pyrene



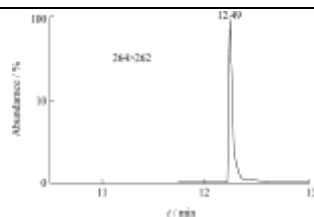


图3 苯并[a]芘标准溶液 (5.0 µg/L) 和内标苯并[a]芘-d12 (10.0 µg/L) 的提取离子色谱图

Fig.3 Selected ion chromatograms of the mixed standard solution of benzo[a]pyrene (5.0 µg/L) and the internal standard of benzo[a]pyrene - d12 (10.0 µg/L)

### 2.3 线性关系、检出限和定量限

按 1.2 配制系列待测物标准工作溶液, 苯并[a]芘的浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10、50、100 µg/L; 均含 10.0 µg/L 内标苯并[a]芘-d<sub>12</sub>。按本实验仪器条件进行检测, 以待测物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标 (y), 以相应的质量浓度为横坐标 (x) 作曲线, 得到待测物的线性方程。对阴性山茶油样品加标、前处理后的样液进行检测, 计算方法的检出限 (LOD, S/N=3) 和定量限 (LOQ, S/N=10)。苯并[a]芘在 0.5~100 µg/L 的浓度范围内线性关系良好, 线性回归方程为  $y=0.0122x-0.0148$ , 相关系数为 0.999 4, 方法检出限为 0.20 µg/kg, 定量限为 0.50 µg/kg。

### 2.4 方法的回收率与精密度

选取阴性山茶油样品, 按本实验方法进行 3 个加标水平的回收率和精密度实验, 均加入 20 µL 0.5 mg/L 苯并[a]芘-d<sub>12</sub> 内标溶液, 计算其回收率和相对标准偏差, 采用中间浓度的加标水平连续测定 5 d, 计算日间回收率和精密度, 实验结果见表 2。在添加浓度范围内, 苯并[a]芘的平均回收率为 92.51~103.70%, 相对标准偏差为 3.84~5.80%, 日间回收率为 94.71~110.83%, 精密度为 5.22~8.92%, 表明方法的回收率、准确度和精密度良好。

表2 山茶油的添加回收率和精密度实验数据

Table 2 Recoveries and repeatabilities for benzo[a]pyrene in camellia oil

Intra-day RSD (% , n=6)			Inter-day RSD (% , n=5)		
Added w/(µg/kg)	Recovery /%	RSD /%	Added w/(µg/kg)	Recovery /%	RSD /%
0.50	98.43	5.80		94.71	8.92
1.00	92.51	3.84	1.00	110.83	6.14
5.00	103.70	4.33		97.12	5.22

### 2.5 实际样品的检测

使用本方法测定了 18 个本地市场上购买的山茶油样品。16 个样品中苯并[a]芘含量低于欧盟 2 µg/kg 的限量值, 2 个样品的含量高于欧盟的限量值但均低于我国国家标准中 10 µg/kg 限量值, 其检出的目标物的谱图如图 4 所示。

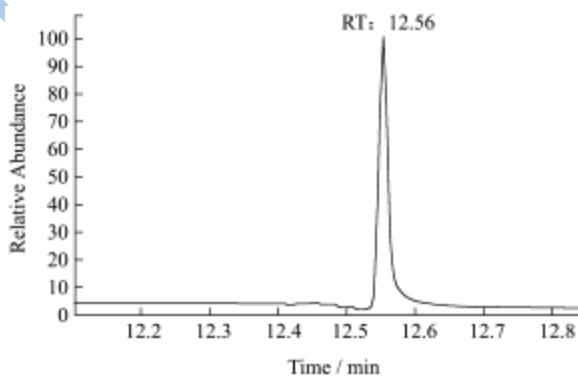


图4 山茶油样品中检出的目标物的提取离子色谱图

Fig.4 Selected ion chromatograms of benzo[a]pyrene in camellia oil sample

## 3 结论

采用液液萃取, 结合同位素内标法, 建立了山茶油样品中苯并[a]芘的气相色谱-三重串联四极杆质谱



(GC-MS/MS)测定方法。试验对前处理条件、色谱分离条件和质谱参数进行了优化,优选出最佳的实验条件。通过对方法回收率、精密度等方法学技术指标的研究,表明方法准确、前处理简单,具有较高的回收率和精密度,可为定性定量分析山茶油样品中苯并[a]芘提供一种准确有效的检测方法。

### 参考文献

- [1] Watanabe K H, Djordjevic M V, Stellman S D, et al. Incremental lifetime cancer risks computed for benzo[a]pyrene and two tobacco-specific N-nitrosamines in mainstream cigarette smoke compared with lung cancer risks derived from epidemiologic data [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2009, 55(2):123-133
- [2] Fromberg A, Hojgard A, Duedahl-Olesen L. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils combining gel permeation chromatography with solid phase extraction clean up [J]. *Food Addit. Contam.*, 2007, 24(7): 758-767
- [3] Guillen M D, Sopelana P, Palencia G. Polycyclic aromatic hydrocarbons and olive pomace oil [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(7):2123-2132
- [4] 肖苏尧,车科,陈雪香,等.不同油茶籽油提取工艺中苯并(a)芘形成的溯源[J].*现代食品科技*,2012,28(2):156-159,181  
Xiao S Y, Che K, Chen X X, et al. Tracing of Benzopyrene in Camellia Oleifera Oil made by different Extraction Methods [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(2): 156-159, 181
- [5] 祝伟霞,杨冀州,袁萍,等.大气压化学电离-液相色谱串联质谱法测定油基食品中的 18 种邻苯二甲酸酯类化合物[J].*现代食品科技*,2012,28(1):115-118  
Zhu W X, Yang J Z, Yuan P, et al. Determination of 18 Phthalic Acid Esters Compounds in Oily Foodstuffs by Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(1): 115-118
- [6] Purcaro G, Moret S, Conte LS. Rapid SPE - HPLC determination of the 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(22): 3936- 3944
- [7] Alomirah H, Al-Zenki S, Husain A, et al. Benzo [a] pyrene and total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in vegetable oils and fats do not reflect the occurrence of the eight genotoxic PAHs [J]. *Food Addit Contam*, 2010, 27(6): 869- 878
- [8] Wang J H, Guo C. Ultrasonic extraction and gel permeation chromatography clean up for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oil by an isotope dilution gas chromatography - mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217 (28): 4732-4737
- [9] 徐小民,蔡增轩,任一平,等.食用植物油中苯并[a]芘的在线凝胶色谱-气质联用测定[J].*中国卫生检验杂志*,2012,22(7): 1479-1480,1483  
Xu X M, Cai Z X, Ren Y P, et al. Determination of benzo[a]pyrene in edible vegetable oil by online gel permeation chromatography -gas chromatography /mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2012, 22(7): 1479-1480, 1483
- [10] 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  
Liu H C, Li Q W, Liu J F. Determination of Benzo [a] pyrene in Vegetable Oil by Liquid Chromatography with Matrix Solid Phase Dispersion [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, 24(4): 415
- [11] 刘玉兰,张小涛,赵欢欢.液相色谱-串联质谱法检测食用油脂中苯并芘[J].*农业机械*,2012,10:45-48  
Liu Y L, Zhang X T, Zhao H H. Determination of Benzo [a] pyrene in Edible Vegetable Oil by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. *Farm Machinery*, 2012, (10): 45-48
- [12] 郭新东,洗燕萍,罗海英,等.气相色谱-三重串联四极杆质谱法测定粮谷中 169 种农药的残留量[J].*现代食品科技*,2012, 28(6):695-702  
Guo X D, Xian Y P, Luo H Y, et al. Determination of 169 Pesticide Residues in Grains by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(6): 695-702