



T/CAIA

中国分析测试协会标准

T/CAIA/SH 018—2022T/CSTM 00745—2022/ (IDT)

植物油 苯并(a)芘测定 超临界流体色谱 在线净化-反相高效液相色谱法

**Vegetable oils—Determination of benzo(a)pyrene
—Reverse phase high performance liquid chromatography method with on-line
supercritical fluid chromatography clean up**

2022-02-21 发布

2022-05-21 实施

中国分析测试协会
中关村材料试验技术联盟

前 言

本文件参照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》，GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定起草。

T/CSTM 00745 —2022与T/CAIA/SH 018-2022一致程度为等同（IDT）。

本文件由中国材料与试验团体标准委员会综合标准领域委员会（CSTM/FC99）和中国分析测试协会共同提出。

本文件由中国材料与试验团体标准委员会科学试验领域委员会（CSTM/FC98）和中国分析测试协会共同归口。

中国团体标准信息网

引 言

本文的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到 1 条与 6.1 超临界流体色谱—反相液相色谱联用系统（SFC-RPLC）相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：岛津企业管理（中国）有限公司

地址：中国上海市上海自由贸易试验区富特西一路 381 号汤臣园区 A1 楼第 6 层 B 部位

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

植物油 苯并(a)芘测定

超临界流体色谱在线净化-反相高效液相色谱法

重要提示： 使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了使用超临界流体色谱在线净化-反相高效液相色谱法测定植物油中苯并(a)芘的方法。

本文件适用于植物油中质量分数为 0.5 µg/kg~50 µg/kg 的苯并(a)芘的测定。

注：本文件规定的范围是经过实验室间共同试验验证过的，通过改变试料量可能能够扩大测定范围。一旦扩展了测定范围，实验室应采用实验手段加以确认。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 5524 动植物油脂扦样

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

超临界流体 supercritical fluid

SCF

处于临界温度和临界压力以上的流体。

3.2

超临界流体色谱法 supercritical fluid chromatography

SFC

以超临界流体作为流动相的一种色谱方法。

4 原理

试料经正己烷溶解后，使用超临界流体色谱（SFC）-反相液相色谱（RPLC）二维系统对该溶液进行在线超临界流体色谱分离净化后，用中心切割的方式将苯并(a)芘导入到第二维的反相高效液相色谱系统进行分离，荧光检测器检测，外标法定量。

5 试剂或材料

5.1 除非另有说明，在分析中仅使用确认为色谱纯的试剂和 GB/T 6682-2008 规定的一级水。

5.2 正己烷。

5.3 异丙醇。

5.4 甲醇。

5.5 乙腈。

5.6 甲苯。

5.7 液体二氧化碳

纯度 \geq 99.99 %（质量分数）。

警示：苯并(a)芘是一种已知致癌物质，所有相关工作均应在通风橱中进行，佩戴手套以减少暴露。

5.8 苯并(a)芘标准储备液，100 μ g/mL

称取 1.0 mg 苯并(a)芘标准品（纯度不低于 99.0 %（质量分数）），精确到 0.01 mg。置于 10 mL 容量瓶中，用甲苯（见 5.6）溶解，定容。避光保存在 0 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 冰箱中，保存期 1 年。

5.9 苯并(a)芘标准中间液，1.0 μ g/mL

移取 0.1 mL 苯并(a)芘标准储备液（见 5.8），用乙腈（见 5.5）定容到 10 mL。避光保存在 0 $^{\circ}$ C~5 $^{\circ}$ C 冰箱中，保存期 1 个月。

5.10 苯并(a)芘标准工作液

将苯并(a)芘标准中间液（见 5.9）用异丙醇（见 5.3）稀释，得到浓度分别为 0.05ng/mL、0.2ng/mL、0.5ng/mL、1.0ng/mL、2.0ng/mL、5.0ng/mL 的校准曲线溶液，用时现配。

6 仪器设备

6.1 超临界流体色谱—反相液相色谱联用系统（SFC-RPLC）

配有高压两位六通阀和荧光检测器，或性能相当者。超临界流体色谱在线净化系统配置图和工作原理参见附录 A 中图 A.1 和图 A.2。

6.2 涡旋振荡器

转速不低于 1000rpm。

6.3 分析天平

感量为 0.01 mg 和 1 mg。

6.4 玻璃具塞刻度试管

10 mL。

6.5 玻璃样品瓶

约 1mL，配有可密封的盖子。

7 样品

按照GB/T 5524的规定扦样。在采样过程中，注意防止样品污染。

8 试验步骤

8.1 试液制备

称取1.00 g样品，精确到0.001 g。

将试料置于10 mL玻璃具塞刻度试管（见6.4）中，加入正己烷（见5.2）定容。用涡旋振荡器（见6.2）振荡1 min，混匀，转移至1 mL玻璃样品瓶（见6.5），待测。

8.2 推荐的仪器条件

推荐的仪器条件如下：

- a) SFC色谱净化柱：二醇基柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm ，或性能相当者；
- b) 预处理柱：C₁₈柱，柱长50 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm ，或性能相当者；
- c) 分析色谱柱：C₁₈柱，柱长150 mm，内径2.1 mm，粒径5 μm ，或性能相当者；
- d) 柱温：40° C；
- e) SFC流动相组成、梯度洗脱、阀切换参考条件见附录A；
- f) 分析流动相组成：乙腈水混合溶液（体积比：9:1）；
- g) 分析流动相流速：1 mL/min；
- h) 洗针液：异丙醇；
- i) 进样量：20 μL ；
- j) 荧光检测器：激发波长384nm，发射波长406nm；
- k) 室温：控制在18 °C ~30 °C范围内。

8.3 校准曲线的绘制

将苯并(a)芘标准工作液（见5.10）分别注入系统，测定相应色谱峰。以标准系列工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，得到校准曲线回归方程，苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图，见附录B。

8.4 试样溶液的测定

将待测试液（见8.1）进样测定，得到苯并(a)芘色谱峰面积。根据校准曲线回归方程，计算试液中苯并(a)芘的浓度。

9 试验数据处理

试样中苯并(a)芘的含量按式(1)计算:

$$w_{\text{BaP}} = \frac{\rho \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中:

- w_{BaP} ——试样中苯并(a)芘含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 ρ ——由校准曲线得到的试液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
 V ——试液定容体积,单位为毫升(mL);
 m ——样品质量,单位为克(g);
1000——分别为 ng 到 μg 和 g 到 kg 的转换因子。

试验结果保留到小数点后一位。

10 精密度

本文件的精密度已通过试验验证,精密度原始数据见附录C。

苯并(a)芘含量与试验结果的重复性限(r)和再现性限(R)间呈对数关系,见表1。

表1 精密度

苯并(a)芘含量 $\mu\text{g}/\text{kg}$	重复性限 r	再现性限 R
0.5~50	$\lg r = 0.7190 \lg w - 0.7452$	$\lg R = 0.7249 \lg w - 0.2695$

注: w 为测量结果的平均值。

在重复性条件下,获得的两次独立测量结果的绝对差值应不大于重复性限 r ,以大于重复性限 r 的情况不超过5%为前提。

在再现性条件下,获得的两次独立测量结果的绝对差值应不大于再现性限 R ,以大于再现性限 R 的情况不超过5%为前提。

11 质量控制

建立校准曲线后,应用质控样品确认校准曲线的有效性。

在样品测定过程中,每隔一段时间应注入校准溶液或质控样品进行检查,如测定值与标准值的差值超过测定平均值的 $\pm 10\%$ (使用质控样品应考虑不确定度),重新绘制校准曲线。校准溶液或质控样品的浓度以限量值或被测物附近的浓度为宜。

12 试验报告

试验报告至少应给出以下几个方面的内容:

- 识别样品、实验室和试验日期所需的全部资料;
- 引用文件号;
- 结果及其表示;

- d) 测定中发现的异常现象；
- e) 对结果可能已产生影响的本文件中未作规定的各种操作或任选的操作。

13 其他

本方法检出限应不大于 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限应不大于 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

全国团体标准信息平台

附录 A (资料性)

超临界流体色谱—反相液相色谱联用系统 (SFC-RPLC) 配置和流动相条件

A.1 SFC-RPLC系统及工作原理

使用高压切换六通阀将超临界流体色谱 (SFC) 与液相色谱 (LC) 联用, 配合荧光检测器, 进行植物油样品的在线净化和其中苯并(a)芘的检测定量。超临界流体色谱在线净化系统配置图参见图A.1。

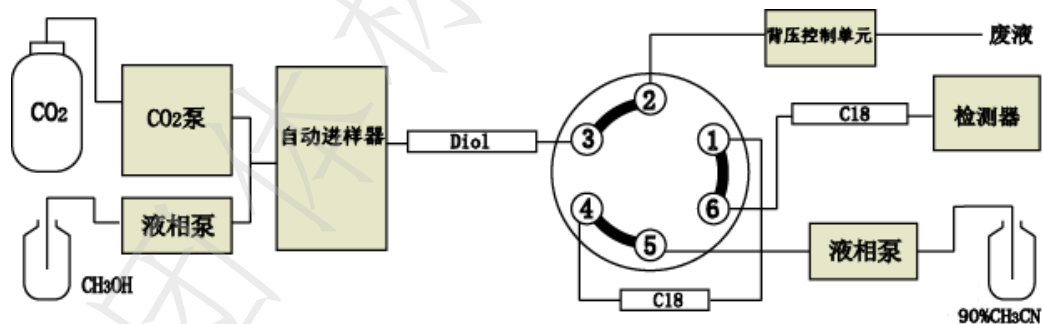
A.2 样品分析

样品分析主要分以下三步:

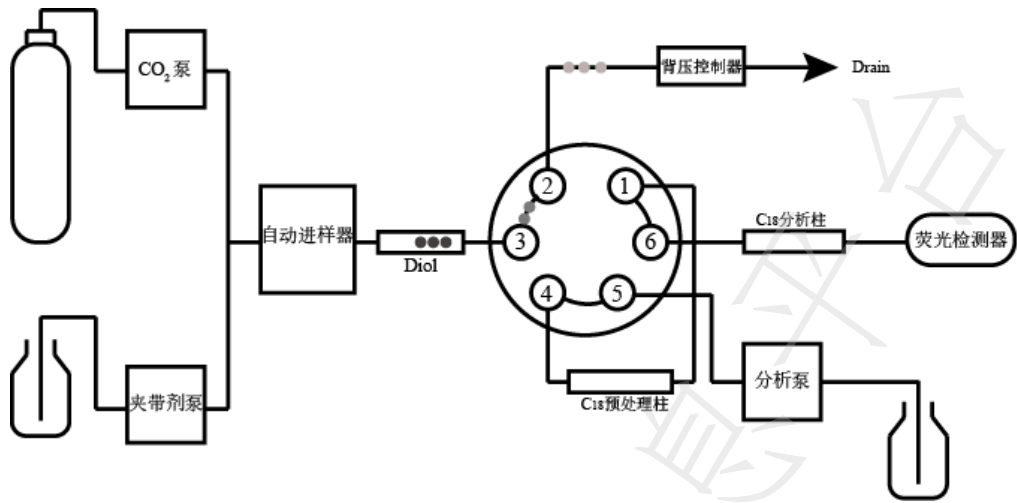
a) 当六通阀处于图A.2 a) 所示位置时, Diol柱通过六通阀直接和背压控制器BPR连接, 正己烷稀释后的植物油样品通过自动进样器注入, 在超临界二氧化碳流体和夹带剂甲醇的共同作用下, 弱极性的苯并(a)芘被保留在Diol柱上, 非极性的脂质被优先洗脱下来, 通过BPR流入废液;

b) 在苯并(a)芘即将从Diol柱中溶出时, 六通阀的位置切换至图A.2 b) 所示位置。此时, Diol柱通过六通阀与C₁₈预处理柱串联后, 进一步和BPR进行连接。使用甲醇将苯并(a)芘从Diol柱中洗脱下来, 进入到C₁₈预处理柱中并被保留。在这个过程中, 系统中的超临界二氧化碳流体被优先洗脱到废液当中。

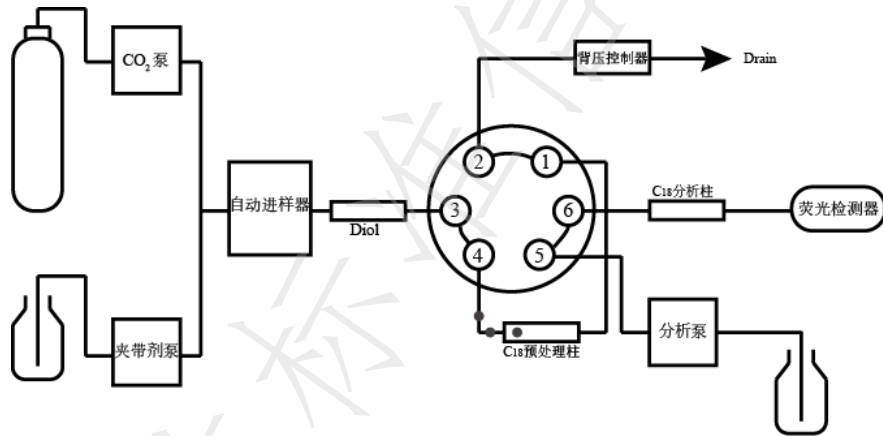
c) 在苯并(a)芘即将从C₁₈预处理柱中溶出时, 六通阀切换至图A.2 c) 所示位置。此时, C₁₈预处理柱和C₁₈分析柱串联, 在第二维分析流动相的作用下, 苯并(a)芘从预处理小柱进入到分析柱中, 与杂质进行分离后, 使用荧光检测器检测。



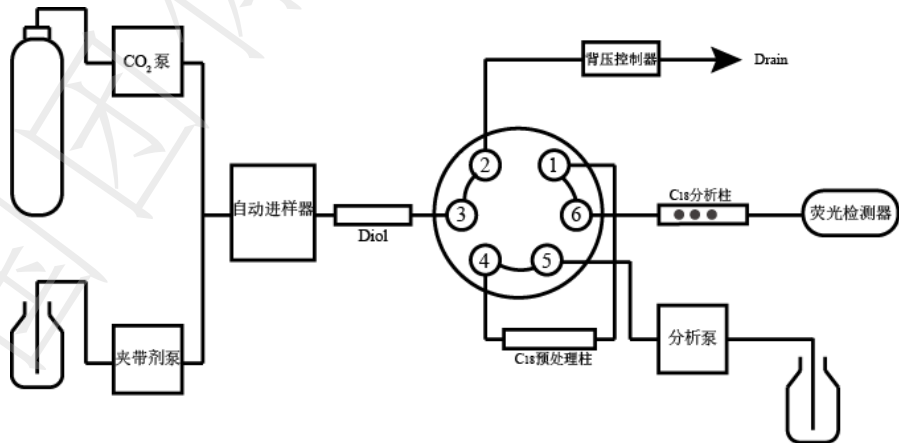
图A.1 SFC-RPLC系统配置图



a) 植物油净化



b) 二氧化碳去除



c) 苯并(a) 芘分离检测。

图 A.2 样品分析示意图。

A.3 超临界流体色谱在线净化系统流动相参考条件

超临界流体色谱在线净化系统流动相参考条件如下：

- a) SFC流动相组成：A.超临界二氧化碳流体；B.甲醇。
- b) SFC流动相参考梯度条件见表 A. 1。
- c) 背压调节器（BPR）压力：15MPa，温度：50℃。

表A.1 超临界流体色谱洗脱条件

时间/min	A 超临界二氧化碳(%)	B 甲醇(%)	流速(mL/min)	六通阀位置
0.00	98	2	3	1-6
9.49	98	2	3	1-6
9.50	0	100	1	1-2
13.49	0	100	1	1-2
13.5	98	2	3	1-6
20	98	2	3	1-6

附录B

(资料性)

苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图

苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图见图B.1和图B.2。

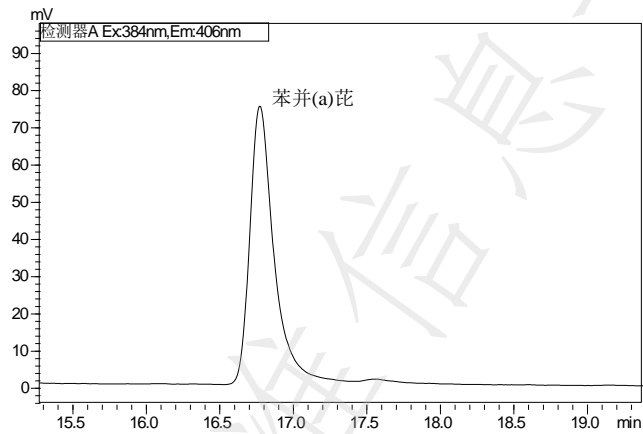
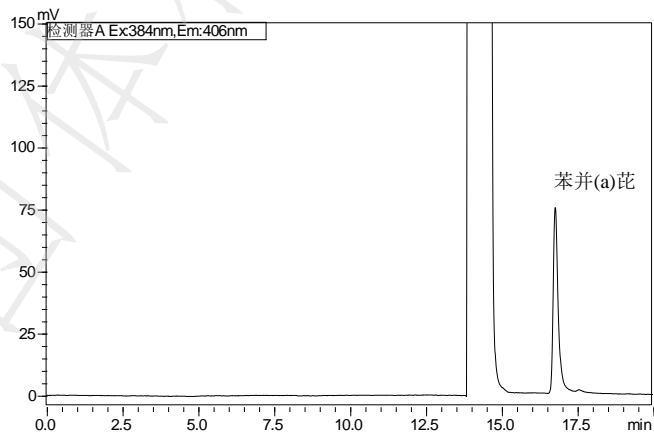


图 B.1 苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图 (15.5 min ~18.5min)



图B.2 苯并(a)芘标准溶液的液相色谱图 (0~20min)

附录 C

(资料性)

精密度原始数据

本文件的精密度是参考 ISO 15302:2017 和 GB 5009.27-2016 的精密度,并结合 8 组实验室验证的结果给出的,精密度的原始数据列于表 C.1。

表C.1 精密度

苯并(a)芘含量 μg/kg	重复性限 <i>r</i>	再现性限 <i>R</i>
0.5	0.1	0.3
1	0.2	0.6
2	0.3	0.9
5	0.6	1.8
10	0.9	2.7
20	1.4	4.2
50	3.2	10

附录 D
(资料性)
起草单位和主要起草人

本标准起草单位：岛津企业管理（中国）有限公司、国家粮食和物资储备局科学研究院、中关村材料试验技术联盟、钢研纳克检测技术股份有限公司、张家口市食品药品检验中心。

本标准主要起草人：郭彦丽、滕晓宇、许康、罗倩华、曹磊、李晓东、杨晓春、谢刚、黎睿、唐凌天、唐本玲、杜佳欢、宫晓平、董琨、崔璐璐。

全国团体标准信息平台

参 考 文 献

- [1] GB 5009.27-2016 食品安全国家标准 食品中苯并(a)芘的测定
- [2] ISO 15302: 2017 Animal and vegetable fats and oils - Determination of benzo[a]pyrene - Revers-phase high performance liquid chromatography method.
- [3] ASTM E1449-92 Standard guide for supercritical fluid chromatography terms and relationships.
-