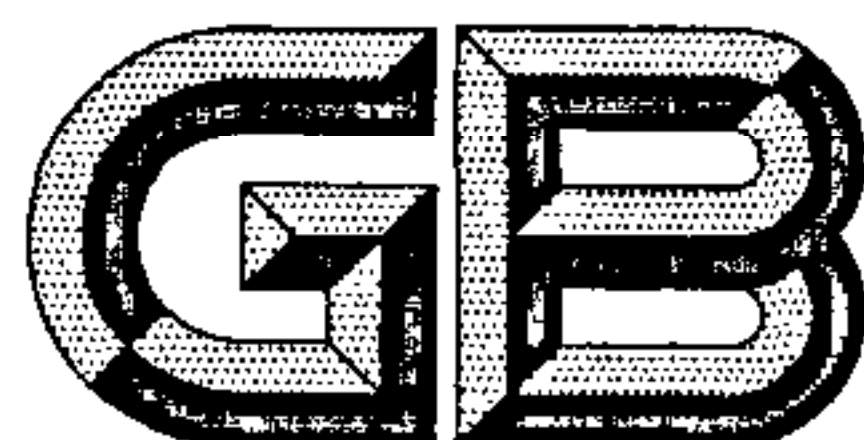


ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.27—2003
代替 GB/T 5009.27—1996

食品中苯并(a)芘的测定

Determination of benzo (a) pyrene in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

217

前 言

本标准代替 GB/T 5009.27—1996《食品中苯并(a)芘的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.27—1996 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中苯并(a)芘的测定》；

——对方法的内容进行了修改；

——按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由辽宁省卫生防疫站、江苏省卫生防疫站、北京市卫生防疫站、广西壮族自治区卫生防疫站、上海市卫生防疫站、新疆维吾尔自治区卫生防疫站负责起草。

本标准于 1985 年首次发布，于 1996 年第一次修订，本次为第二次修订。

食品中苯并(a)芘的测定

1 范围

本标准规定了食品中苯并(a)芘的测定方法。

本标准适用于食品中苯并(a)芘的测定。

本方法检出限:试样量为 50 g,点样量为 1 g 时为 1 ng/g。

第一法 荧光分光光度法

2 原理

试样先用有机溶剂提取,或经皂化后提取,再将提取液经液-液分配或色谱柱净化,然后在乙酰化滤纸上分离苯并(a)芘,因苯并(a)芘在紫外光照射下呈蓝紫色荧光斑点,将分离后有苯并(a)芘的滤纸部分剪下,用溶剂浸出后,用荧光分光光度计测荧光强度与标准比较定量。

3 试剂

3.1 苯:重蒸馏。

3.2 环己烷(或石油醚,沸程 30℃~60℃):重蒸馏或经氧化铝柱处理无荧光。

3.3 二甲基甲酰胺或二甲基亚砷。

3.4 无水乙醇:重蒸馏。

3.5 乙醇(95%)。

3.6 无水硫酸钠。

3.7 氢氧化钾。

3.8 丙酮:重蒸馏。

3.9 展开剂:乙醇(95%)-二氯甲烷(2:1)。

3.10 硅镁型吸附剂:将 60 目~100 目筛孔的硅镁吸附剂经水洗四次(每次用水量为吸附剂质量的 4 倍)于垂融漏斗上抽滤干后,再以等量的甲醇洗(甲醇与吸附剂量克数相等),抽滤干后,吸附剂铺于干净瓷盘上,在 130℃干燥 5 h 后,装瓶贮存于干燥器内,临用前加 5%水减活,混匀并平衡 4 h 以上,最好放置过夜。

3.11 层析用氧化铝(中性):120℃活化 4 h。

3.12 乙酰化滤纸:将中速层析用滤纸裁成 30 cm×4 cm 的条状,逐条放入盛有乙酰化混合液(180 mL 苯、130 mL 乙酸酐、0.1 mL 硫酸)的 500 mL 烧杯中,使滤纸充分地接触溶液,保持溶液温度在 21℃以上,时时搅拌,反应 6 h,再放置过夜。取出滤纸条,在通风橱内吹干,再放入无水乙醇中浸泡 4 h,取出后放在垫有滤纸的干净白瓷盘上,在室温内风干压平备用,一次可处理滤纸 15 条~18 条。

3.13 苯并(a)芘标准溶液:精密称取 10.0 mg 苯并(a)芘,用苯溶解后移入 100 mL 棕色容量瓶中,并稀释至刻度,此溶液每毫升相当于苯并(a)芘 100 μg。放置冰箱中保存。

3.14 苯并(a)芘标准使用液:吸取 1.00 mL 苯并(a)芘标准溶液置于 10 mL 容量瓶中,用苯稀释至刻度,同法依次用苯稀释,最后配成每毫升相当于 1.0 及 0.1 μg 苯并(a)芘两种标准使用液,放置冰箱中保存。

4 仪器

4.1 脂肪提取器。

4.2 层析柱:内径 10 mm,长 350 mm,上端有内径 25 mm,长 80 mm~100 mm 内径漏斗,下端具有活塞。

4.3 层析缸(筒)。

4.4 K-D 全玻璃浓缩器。

4.5 紫外光灯:带有波长为 365 nm 或 254 nm 的滤光片。

4.6 回流皂化装置:锥形瓶磨口处连接冷凝管。

4.7 组织捣碎机。

4.8 荧光分光光度计。

5 分析步骤

5.1 试样提取

5.1.1 粮食或水分少的食品:称取 40.0 g~60.0 g 粉碎过筛的试样,装入滤纸筒内,用 70 mL 环己烷润湿试样,接收瓶内装 6 g~8 g 氢氧化钾、100 mL 乙醇(95%)及 60 mL~80 mL 环己烷,然后将脂肪提取器接好,于 90℃ 水浴上回流提取 6 h~8 h,将皂化液趁热倒入 500 mL 分液漏斗中,并将滤纸筒中的环己烷也从支管中倒入分液漏斗,用 50 mL 乙醇(95%)分两次洗接收瓶,将洗液合并于分液漏斗。加入 100 mL 水,振摇提取 3 min,静置分层(约需 20 min),下层液放入第二分液漏斗,再用 70 mL 环己烷振摇提取一次,待分层后弃去下层液,将环己烷层合并于第一分液漏斗中,并用 6 mL~8 mL 环己烷淋洗第二分液漏斗,洗液合并。

用水洗涤合并后的环己烷提取液三次,每次 100 mL,三次水洗液合并于原来的第二分液漏斗中,用环己烷提取两次,每次 30 mL,振摇 0.5 min,分层后弃去水层液,收集环己烷液并入第一分液漏斗中,于 50℃~60℃ 水浴上,减压浓缩至 40 mL,加适量无水硫酸钠脱水。

5.1.2 植物油:称取 20.0 g~25.0 g 的混匀油样,用 100 mL 环己烷分次洗入 250 mL 分液漏斗中,以环己烷饱和过的二甲基甲酰胺提取三次,每次 40 mL,振摇 1 min,合并二甲基甲酰胺提取液,用 40 mL 经二甲基甲酰胺饱和过的环己烷提取一次,弃去环己烷液层。二甲基甲酰胺提取液合并于预先装有 240 mL 硫酸钠溶液(20 g/L)的 500 mL 分液漏斗中,混匀,静置数分钟后,用环己烷提取两次,每次 100 mL,振摇 3 min,环己烷提取液合并于第一个 500 mL 分液漏斗。也可用二甲基亚砜代替二甲基甲酰胺。

用 40℃~50℃ 温水洗涤环己烷提取液两次,每次 100 mL,振摇 0.5 min,分层后弃去水层液,收集环己烷层,于 50℃~60℃ 水浴上减压浓缩至 40 mL,加适量无水硫酸钠脱水。

5.1.3 鱼、肉及其制品:称取 50.0 g~60.0 g 切碎混匀的试样,再用无水硫酸钠搅拌(试样与无水硫酸钠的比例为 1:1 或 1:2,如水分过多则需在 60℃ 左右先将试样烘干),装入滤纸筒内,然后将脂肪提取器接好,加入 100 mL 环己烷于 90℃ 水浴上回流提取 6 h~8 h,然后将提取液倒入 250 mL 分液漏斗中,再用 6 mL~8 mL 环己烷淋洗滤纸筒,洗液合并于 250 mL 分液漏斗中,以下按 5.1.2 自“以环己烷饱和过的二甲基甲酰胺提取三次……”起依法操作。

5.1.4 蔬菜:称取 100.0 g 洗净、晾干的可供食用的蔬菜,切碎放入组织捣碎机内,加 150 mL 丙酮,捣碎 2 min。在小漏斗上加少许脱脂棉过滤,滤液移入 500 mL 分液漏斗中,残渣用 50 mL 丙酮分数次洗涤,洗液与滤液合并,加 100 mL 水和 100 mL 环己烷,振摇提取 2 min,静置分层,环己烷层转入另一 500 mL 分液漏斗中,水层再用 100 mL 环己烷分两次提取,环己烷提取液合并于第一个分液漏斗中,再用 250 mL 水,分两次振摇、洗涤,收集环己烷于 50℃~60℃ 水浴上减压浓缩至 25 mL,加适量无水硫酸钠脱水。

5.1.5 饮料(如含二氧化碳先在温水浴上加温除去):吸取 50.0 mL~100.0 mL 试样于 500 mL 分液漏斗中,加 2 g 氯化钠溶解,加 50 mL 环己烷振摇 1 min,静置分层,水层分于第二个分液漏斗中,再用 50 mL 环己烷提取一次,合并环己烷提取液,每次用 100 mL 水振摇、洗涤两次,收集环己烷于 50℃~

60℃水浴上减压浓缩至 25 mL,加适量无水硫酸钠脱水。

5.1.6 糕点类:称取 50.0 g~60.0 g 磨碎试样,装于滤纸筒内,以下按 5.1.1 自“用 70 mL 环己烷湿润试样……”起依法操作。

在 5.1.1、5.1.3~5.1.6 各项操作中,均可用石油醚代替环己烷,但需将石油醚提取液蒸发至近干,残渣用 25 mL 环己烷溶解。

5.2 净化

5.2.1 于层析柱下端填入少许玻璃棉,先装入 5 cm~6 cm 的氧化铝,轻轻敲管壁使氧化铝层填实、无空隙,顶面平齐,再同样装入 5 cm~6 cm 的硅镁型吸附剂,上面再装入 5 cm~6 cm 无水硫酸钠,用 30 mL 环己烷淋洗装好的层析柱,待环己烷液面流下至无水硫酸钠层时关闭活塞。

5.2.2 将试样环己烷提取液倒入层析柱中,打开活塞,调节流速为每分钟 1 mL,必要时可用适当方法加压,待环己烷液面下降至无水硫酸钠层时,用 30 mL 苯洗脱,此时应在紫外光灯下观察,以蓝紫色荧光物质完全从氧化铝层洗下为止,如 30 mL 苯不足时,可适当增加苯量。收集苯液于 50℃~60℃水浴上减压浓缩至 0.1 mL~0.5 mL[可根据试样中苯并(a)芘含量而定,应注意不可蒸干]。

5.3 分离

5.3.1 在乙酰化滤纸条上的一端 5 cm 处,用铅笔划一横线为起始线,吸取一定量净化后的浓缩液,点于滤纸条上,用电吹风从纸条背面吹冷风,使溶剂挥发,同时点 20 μL 苯并(a)芘的标准使用液(1 μg/mL),点样时斑点的直径不超过 3 mm,层析缸(筒)内盛有展开剂,滤纸条下端浸入展开剂约 1 cm,待溶剂前沿至约 20 cm 时取出阴干。

5.3.2 在 365 nm 或 254 nm 紫外光灯下观察展开后的滤纸条用铅笔划出标准苯并(a)芘及与其同一位置的试样的蓝紫色斑点,剪下此斑点分别放入小比色管中,各加 4 mL 苯加盖,插入 50℃~60℃水浴中不时振摇,浸泡 15 min。

5.4 测定

5.4.1 将试样及标准斑点的苯浸出液移入荧光分光光度计的石英杯中,以 365 nm 为激发光波长,以 365 nm~460 nm 波长进行荧光扫描,所得荧光光谱与标准苯并(a)芘的荧光光谱比较定性。

5.4.2 与试样分析的同时做试剂空白,包括处理试样所用的全部试剂同样操作,分别读取试样、标准及试剂空白于波长 406 nm、(406+5) nm、(406-5) nm 处的荧光强度,按基线法由式(1)计算所得的数值,为定量计算的荧光强度。

$$F = F_{406} - (F_{401} + F_{411})/2 \quad \dots\dots\dots(1)$$

5.5 结果计算

试样中苯并(a)芘的含量按式(2)进行计算。

$$X = [S/F \times (F_1 - F_2) \times 1000]/(m \times V_2/V_1) \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X——试样中苯并(a)芘的含量,单位为微克每千克(μg/kg);

S——苯并(a)芘标准斑点的质量,单位为微克(μg);

F——标准的斑点浸出液荧光强度,单位为毫米(mm);

F₁——试样斑点浸出液荧光强度,单位为毫米(mm);

F₂——试剂空白浸出液荧光强度,单位为毫米(mm);

V₁——试样浓缩液体积,单位为毫升(mL);

V₂——点样体积,单位为毫升(mL);

m——试样质量,单位为克(g)。

计算结果表示到一位小数。

5.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

第二法 目测比色法

6 原理

试样经提取、净化后于乙酰化滤纸上层析分离苯并(a)芘,分离出的苯并(a)芘斑点,在波长 365 nm 的紫外灯下观察,与标准斑点进行目测比色概略定量。

7 试剂

同 3.1~3.14。

8 仪器

同 4.1~4.8。

9 分析步骤

9.1 试样提取

按 5.1 的方法操作。

9.2 净化

按 5.2 的方法操作。

9.3 测定

吸取 5、10、15、20 或 50 μL 试样浓缩液[可根据试样中苯并(a)芘含量而定]及 10、20 μL 苯并(a)芘标准使用液(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),点于同一条乙酰化滤纸上,按 5.3.1 展开,取出阴干。

于暗室紫外灯下目测比较,找出相当于标准斑点荧光强度的试样浓缩液体积,如试样含量太高,可稀释后再重点,尽量使试样浓度在两个标准斑点之间。

9.4 结果计算

试样中苯并(a)芘的含量按式(3)进行计算。

$$X = (m_2 \times 1\,000) / (m_1 \times V_2 / V_1) \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X——试样中苯并(a)芘的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

m_2 ——试样斑点相当苯并(a)芘的质量,单位为微克(μg);

V_1 ——试样浓缩总体积,单位为毫升(mL)。

V_2 ——点样体积,单位为毫升(mL);

m_1 ——试样质量,单位为克(g)。