

应用高效液相色谱法测定谷物中 15 种多环芳烃

于海燕, 徐向阳, 刘瀚升

朝阳市疾病预防控制中心, 辽宁 朝阳 122000

摘要: **目的** 使用高效液相色谱法测定谷物中 15 种多环芳烃。 **方法** 样品加入乙腈振荡、超声提取、离心, 转移上清液用氮气吹干, 用乙腈溶解残渣后, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 以乙腈—水作为流动相梯度洗脱, 以 Waters-PHAs 专用柱分离, 通过荧光检测器检测其中多环芳烃。 **结果** 该方法线性关系良好, RSD 0.80% ~ 7.22%, 样品加标回收率 90.0% ~ 110%。 **结论** 该方法前处理简单、准确、灵敏度高、重现性好、成本低, 可以用于谷物中 15 种多环芳烃的检测。

关键词: 高效液相色谱; 多环芳烃; 超声提取; 荧光检测器

中图分类号: R155.5⁺2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2018)12-1531-03 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.036

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是指由两个或两个以上苯环以线状、角状或簇状排列的一类中性或非极性有机化合物^[1], 迄今已发现 200 多种。由于其广泛存在于环境和食品中, 具有致癌性和致突变性^[2-3], 对人类身体危害性很大。人类接触的多环芳烃 70% 以上来自食品, 部分加工工艺如烤、炸、熏制等可导致食品自身成分发生焦化和裂解, 是食用油类、肉类和乳制品中 PAHs 污染的重要来源。美国环境保护署 (United States Environmental Protection Agency, US EPA) 于 1979 列出 16 种 EPA 优控 PAHs, 欧盟食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 于 2008 年列出 16 种欧盟优控 PAHs。我国尚未制定 PAHs 的限量标准, GB 2762-2012《食品安全国家标准食品中污染物限量》仅规定了谷物、熏烤肉类、熏烤水产和植物油这四类食品中苯并(a)芘 (benzo(a)pyrene) 的限量指标。美国环境保护署 (EPA) 列出的 16 种 PAHs, 我国已经制定了标准检测方法 GB 5009.265-2016^[4], 而 EFSA 列出的 16 种 PAHs, 我国还未制定标准检测方法。

目前, 多环芳烃的检测方法主要包括荧光分析法、气相色谱—质谱联用法、高效液相色谱法, 以及紫外吸光光度法等。本文通过对 10 份谷物食品污染物样品中多环芳烃的提取、浓缩、净化和分析, 参考 2017 版《国家食品污染物和有害风险监测工作手册》, 建立了 EFSA 列出的 15 种食品中多环芳烃的高效液相色谱检测方法。该方法前处理简单、准确、灵敏度高、重现性好、成本低, 适用于基层对食品中多环芳烃的检测, 为谷物中多环芳烃的检测提供了新的处理方法。

作者简介: 于海燕 (1974-), 副主任技师, 主要从事食品卫生和环境卫生及地方病检测工作。

1 材料与方法

1.1 试剂 本次实验用水为超纯水。乙腈 (色谱纯); 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司生产标准溶液: 苯并(a)蒽、屈、5-甲基屈、苯并(b)荧蒽、苯并(j)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-cd)芘、二苯并(a, e)芘、二苯并(a, h)芘、二苯并(a, i)芘、二苯并(a, l)芘、苯并(c)芴浓度均为 10.000 mg/L, 溶剂均为乙腈。多环芳烃混合标准中间液: 分别取上述标准储备液各 200 μl 于 20 ml 棕色玻璃瓶中, 用乙腈定容, 配成浓度为 100 ng/ml 的混合标准中间液。多环芳烃混合标准使用液: 吸取上述的混合标准中间液 2.00 ml, 用乙腈稀释至 10 ml, 配制成浓度为 20 ng/ml 标准混合使用液。多环芳烃标准系列: 吸取标准混合使用液 25、50、250、500、1 000 μl , 补加乙腈体积至 1 ml, 此标准系列浓度为 0.5、1.0、5.0、10、20 ng/ml。

1.2 仪器和设备 日本日立 LC-2000 高效液相色谱仪, 带荧光检测器; 电子天平: XS205DU 瑞士梅特勒; 粉碎机; 高速离心机 (转速 10 000 r/min); 超声波振荡器; 涡旋振荡器; 全自动氮吹浓缩仪 (XT-NS1 型)。

1.3 样品处理

1.3.1 试样提取 称取 5.00 g (精确至 0.01 g) 碎后混合均匀的谷物样品至 50 ml 聚丙烯塑料离心管中, 加入 10 ml 乙腈, 振荡 3 min, 超声提取 20 min。以 10 000 r/min 离心 5 min^[5], 转移上清液至氮吹瓶中, 如此提取 2 次, 合并提取液。

1.3.2 试样浓缩 将合并后的提取液用氮气吹干装置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 吹至近干。用 1 ml 乙腈定容残渣, 过 0.45 μm 微孔滤膜后, 转移至棕色进样瓶中, 待 HPLC 分析。4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.4 样品测定

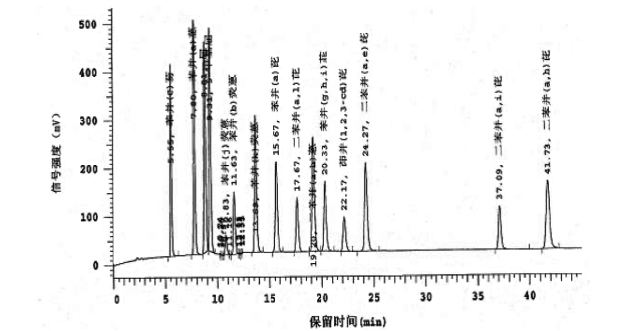
1.4.1 HPLC 参考条件 色谱柱:Waters PAHs 专用柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);柱温:35 ℃;进样量:20 μl;流动相:乙腈和水;梯度洗脱程序见表 1,溶剂 A 为乙腈,溶剂 B 为水。

表 1 梯度洗脱程序

流速 (ml/min)	时间 (min)	流动相	
		A (%)	B (%)
1.2	0.0	80.0	20.0
1.2	5.0	80.0	20.0
1.2	30.0	100.0	0.0
1.2	32.0	100.0	0.0
2.0	33.0	100.0	0.0
2.0	43.0	100.0	0.0
1.2	44.0	80.0	20.0
1.2	48.0	80.0	20.0

表 2 多环芳烃的激发波长、发射波长及其切换色谱时间检测参数

时间 (min)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	待测组分	电压
0	235	355	苯并(c)芘	Medium
7.0	270	385	苯并(a)蒽、屈、5-甲基屈	High
10.0	242	513	苯并(j)荧蒹、苯并(b)荧蒹	Super High
12.5	292	410	苯并(k)荧蒹、苯并(a)芘	Medium
17.0	280	440	二苯并(a,l)芘	High
18.2	292	410	二苯并(a,h)蒽、苯并(g,h,i)芘	High
21.2	274	507	茚并(1,2,3-cd)芘	Super High
23.0	280	410	二苯并(a,e)芘	High
28.0	280	440	二苯并(a,i)芘	High
40.0	310	455	二苯并(a,h)芘	Medium
48.0	235	355		Medium



注: 苯并(c)芘 5.55 min、苯并(a)蒽 7.80 min、屈 8.81 min、5-甲基屈 9.31 min、苯并(j)荧蒹 10.83 min、苯并(b)荧蒹 11.63 min、苯并(k)荧蒹 13.69 min、苯并(a)芘 15.67 min、二苯并(a,l)芘 17.67 min、二苯并(a,h)蒽 19.20 min、苯并(g,h,i)芘 20.33 min、茚并(1,2,3-cd)芘 22.17 min、二苯并(a,e)芘 24.27 min、二苯并(a,i)芘 37.09 min、二苯并(a,h)芘 41.73 min。

图 1 15 种多环芳烃分离色谱图

1.4.2 标准曲线的绘制 将标准系列工作液和样品液分别注入液相色谱仪中,测得相应的峰面积,以标准溶液的浓度为横坐标、以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 方法检出限 通过软件计算 800 为本实验噪声,用 3 倍的噪声值除以每条曲线的斜率得出仪器的检出限,根据计算公式分别计算出方法的检出限为:苯并(c)芘、苯并(a)蒽、屈、5-甲基屈的检出限为 0.01 μg/kg;苯并(k)荧蒹、苯并(a)芘、二苯并(a,h)蒽、二苯并(a,e)芘的检出限为 0.02 μg/kg;苯并(b)荧蒹、二苯并(a,l)芘、苯并(g,h,i)芘、二苯并(a,h)芘的检出限为 0.04 μg/kg;茚并(1,2,3-cd)芘、二苯并(a,i)芘的检出限为 0.07 μg/kg;苯并(j)荧蒹的检出限为 0.1 μg/kg。

2.2 线性回归方程和相关系数 苯并(c)芘的回归方程为 $Y=37\,977X+251$;苯并(a)蒽的回归方程为 $Y=47\,177X+1\,385$;屈的回归方程为 $Y=43\,090X+828$;5-甲基屈的回归方程为 $Y=45\,879X+812$;苯并(j)荧蒹的回归方程为 $Y=3\,624X+500$;苯并(b)荧蒹的回归方程为 $Y=11\,622X+1\,030$;苯并(k)荧蒹回归方程为 $Y=26\,318X+602$;苯并(a)芘的回归方程为 $Y=17\,574X+268$;二苯并(a,l)芘的回归方程为 $Y=10\,432X+509$;二苯并(a,h)蒽的回归方程为 $Y=22\,564X+489$;苯并(g,h,i)芘的回归方程为 $Y=13\,985X+368$;茚并(1,2,3-cd)芘的回归方程为 $Y=6\,762X+241$;二苯并(a,e)芘的回归方程为 $Y=17\,558X-38$;二苯并(a,i)芘的回归方程为 $Y=6\,832X+100$;二苯并(a,h)芘的回归方程为 $Y=12\,536X-249$,相关系数均为 0.999 9。

2.3 方法的精密度和回收率 分别吸取多环芳烃混合标准使用液 50、250、750 μl,加入到谷物中,加入浓度分别为 1.0、5.0、15.0 ng/ml。做加标回收实验,每一种浓度分别按照样品前处理方法提取并测定 6 次,结果见表 3。

表 3 方法的精密度和回收率 (%)

成份	本底值	低浓度			中浓度			高浓度		
		\bar{x}	RSD	回收率	\bar{x}	RSD	回收率	\bar{x}	RSD	回收率
苯并(c)芘	<0.01	1.09	3.53	109	5.42	1.59	108	13.4	1.39	91.3
苯并(a)蒽	<0.01	1.06	4.88	106	5.04	1.52	101	14.5	0.97	96.7
屈	<0.01	1.04	4.73	104	5.11	2.17	102	14.6	0.80	97.3
5-甲基屈	<0.01	0.999	2.34	99.9	4.85	2.57	97.0	14.4	0.98	96.0
苯并(j)荧蒹	<0.1	1.06	3.56	106	5.10	2.07	102	14.8	0.95	98.7
苯并(b)荧蒹	<0.04	1.03	4.86	103	5.07	2.14	101	14.8	1.09	98.7

续表 3

成份	本底值	低浓度			中浓度			高浓度		
		\bar{x}	RSD	回收率	\bar{x}	RSD	回收率	\bar{x}	RSD	回收率
苯并(k)荧蒽	<0.02	0.949	3.72	94.9	4.73	3.14	94.6	14.2	0.94	94.7
苯并(a)芘	<0.02	0.994	2.27	99.4	4.77	2.42	95.4	14.2	0.91	94.7
二苯并(a,l)芘	<0.04	0.902	2.17	90.2	4.69	1.73	93.8	13.7	1.14	91.3
二苯并(a,h)蒽	<0.02	0.914	1.54	91.4	4.71	2.44	94.2	14.0	1.00	93.3
苯并(g,h,i)芘	<0.04	1.10	7.22	110	4.86	2.01	97.2	14.2	0.90	94.7
茚并(1,2,3-cd)芘	<0.07	0.944	1.54	94.4	4.88	3.42	97.6	14.5	1.16	96.7
二苯并(a,e)芘	<0.02	0.902	1.32	90.2	4.63	2.82	92.6	14.2	1.04	94.7
二苯并(a,i)芘	<0.07	0.921	1.04	92.1	4.50	2.72	90.0	13.8	1.01	92.0
二苯并(a,h)芘	<0.04	0.919	1.56	91.9	4.59	3.01	91.8	14.0	1.25	93.3

2.4 实验条件的选择 多环芳烃的检测由于检测的组分多,含量低,既要考虑用梯度洗脱的方法将各组分完全分离,又要考虑让每一种待测组分的检测灵敏度最高。所以在实验过程中梯度洗脱条件的设定和激发波长,发射波长的设定都很重要。苯并(b)荧蒽在激发波长 256 nm、发射波长 446 nm 时灵敏度最大,苯并(j)荧蒽在激发波长 242 nm、发射波长 513 nm 时灵敏度最大,两峰距离较近,当苯并(b)荧蒽选择最大灵敏度波长时,对基线有影响,所以选择灵敏度相对小一点的与

苯并(j)荧蒽相同的波长,基线较好,计算结果准确。

彭希琰等^[6]的高效液相色谱法测定南昌市环境空气 PM₁₀ 中 16 种多环芳烃的方法中苯并(g,h,i)芘、二苯并(a,h)蒽重叠,杜寒春等^[7]的土壤中多环芳烃的高效液相色谱法测定的方法中苯并(a)蒽、苯并(b)荧蒽重叠,而在此方法试验条件中,都得到很好的分离。

2.5 样品测定 对 10 种谷物样品进行检测,结果见表 4。

表 4 10 种谷物样品中多环芳烃的测定结果

成份	样品类别									
	玉米碴 1	玉米碴 2	糙米	玉米面 1	玉米面 2	小麦粉 1	小麦粉 2	大米 1	大米 2	大米 3
苯并(c)芴	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010	<0.01
苯并(a)蒽	<0.010	0.18	0.19	<0.010	<0.010	0.49	<0.010	<0.010	0.26	0.14
屈	<0.010	0.36	0.27	<0.010	0.54	0.52	<0.010	<0.010	0.28	0.12
5-甲基屈	<0.010	<0.010	<0.010	0.27	<0.010	0.16	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010
苯并(j)荧蒽	<0.10	0.37	0.23	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
苯并(b)荧蒽	<0.040	0.23	0.23	0.39	0.28	0.36	<0.040	<0.040	0.19	<0.040
苯并(k)荧蒽	<0.020	<0.020	<0.020	<0.02	<0.020	0.12	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020
苯并(a)芘	<0.020	<0.020	0.12	0.15	0.15	0.22	<0.020	<0.020	0.11	<0.020
二苯并(a,l)芘	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040
二苯并(a,h)蒽	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020
苯并(g,h,i)芘	<0.040	0.22	<0.040	0.22	<0.040	0.20	<0.040	<0.040	0.20	<0.040
茚并(1,2,3-cd)芘	<0.070	<0.070	0.12	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070
二苯并(a,e)芘	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020	<0.020
二苯并(a,i)芘	<0.070	<0.070	0.12	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070	<0.070
二苯并(a,h)芘	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040	<0.040

3 结 论

本方法的样品前处理简单,基质干扰少,通过对 10 种谷物样品的检测,回收率和重现性良好,结果准确可靠,本方法适用于谷物中多环芳烃的检测。

参考文献

[1] 王丹红,吴文晞,李捷,等.QuEChERS/高效液相色谱测定食品中 15 种多环芳烃[J].福建分析测试,2013,22(1):17-20.

[2] 张德云,孙成均,王涛.高效液相色谱法测定室内空气中 13 种多环芳烃[J].华西医学报,2002,33(1):140-143.

[3] 杨财平,马蓓蓓,余青,等.宜昌市 PM_{2.5} 的污染特征及其风险评价[J].实用预防医学,2017,24(10):1209-1212.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局.GB 5009.265-2016 食品安全国家标准 食品中多环芳烃的测定[S].北京:中华人民共和国国家标准出版社,2017:1-10.

[5] 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.GB/T 24893-2010 动植物油脂多环芳烃的测定[S].北京:中华人民共和国国家标准出版社,2010:4.

[6] 彭希琰,何宗健.高效液相色谱法测定南昌市环境空气 PM₁₀ 中 16 种多环芳烃[J].环境污染与防治,2008,30(1):36-39.

[7] 杜寒春,黄岛平,徐慧.土壤中多环芳烃的高效液相色谱法测定[J].广西科学院学报,2010,26(3):245-251.