

实验技术与方法

高效液相色谱荧光法检测海产品中苯并(a)芘及其代谢产物

刘晓晨, 齐琳, 孙文平, 王希佳, 谢真恕, 李发胜, 刘辉

(大连医科大学检验医学院, 辽宁 大连 116044)

摘要:目的 建立检测海产品中苯并(a)芘(BaP)及其代谢产物3-羟基苯并芘(3-OHBaP)的高效液相色谱荧光法(HPLC-FD)。方法 样品经65%乙腈提取,涡旋混匀,离心沉淀,分别以甲醇-水(pH 4.5)(85:15)、(87:13)为流动相进行色谱分离BaP、3-OHBaP,色谱柱为Century SIL C₁₈-BDS(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流速1.0 ml/min;荧光检测器检测BaP激发波长265 nm,发射波长450 nm,检测3-OHBaP激发波长365 nm,发射波长450 nm;进样量20 μl。结果 BaP在0.1~10.0 ng/ml浓度范围内线性关系良好,相关系数 $r = 0.9994$;3-OHBaP在1.07~100.7 ng/ml浓度范围内线性关系良好,相关系数 $r = 0.9921$ 。BaP、3-OHBaP回收率分别在96.8%~112.0%、72.6%~83.3%之间;相对标准偏差分别为6.0%、5.2% ($n = 5$);最低检测限分别为0.1和0.2 μg/kg。结论 该法简便、快速、灵敏度高,可用于海产品中BaP及其代谢产物3-OHBaP的检测。

关键词: 苯并(a)芘; 3-羟基苯并芘; 海产品; 高效液相色谱荧光法

中图分类号: R155; O657.7; O625.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)02-0152-03

Determination of benzo (a) pyrene and its metabolite in seafood by high performance liquid chromatography with fluorescence detection

Liu Xiaochen, Qi Lin, Sun Wenping, Wang Xijia, Xie Zhenshu, Li Fasheng, Liu Hui

(College of Medical Laboratory, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

Abstract: Objective An analytical method for the determination of benzo (a) pyrene and its metabolite 3-hydroxybenzo (a) pyrene in seafood was developed by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD).

Methods The samples were extracted by 65% acetonitrile, treated by vortex blending and centrifugal precipitation. For benzo (a) pyrene and 3-hydroxybenzo (a) pyrene, the chromatographic separation were achieved in CenturySIL C₁₈-BDS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with methanol-water (pH 4.5) (85 : 15), (87 : 13) as mobile phase with a flow rate of 1.0 ml/min, respectively. The benzo (a) pyrene and 3-hydroxybenzo (a) pyrene were detected under FD at $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 265 \text{ nm}/450 \text{ nm}$, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 365 \text{ nm}/450 \text{ nm}$ with an injection volume of 20 μl, respectively. **Results** Benzo (a) pyrene was linear in range of 0.1 ~ 10.0 ng/ml, $r = 0.9994$ and 3-hydroxybenzo (a) pyrene was linear in range of 1.07 ~ 100.7 ng/ml, $r = 0.9921$. For benzo (a) pyrene and 3-hydroxybenzo (a) pyrene, the limit of quantification was 0.1 μg/kg, 0.2 μg/kg, the recoveries were 96.8% ~ 112.0%, 72.6% ~ 83.3%, and the relative standard deviations was 6.0%, 5.2% ($n = 5$), respectively. **Conclusion** The method is simple, rapid and highly sensitive. It is suitable for the determination of benzo (a) pyrene and 3-hydroxybenzo (a) pyrene in seafood.

Key words: Benzo(a)pyrene; 3-hydroxybenzo(a)pyrene; seafood; HPLC-FD

苯并(a)芘[Benzo(a)pyrene],简称BaP,是一种强致癌性多环芳烃类化合物^[1-2],通过降雨、船舶漏油及废水排放等进入水体,再通过食物链在动植物体中发生生物蓄积,造成水产品的BaP污

染。对于水产品中BaP的含量,欧盟指令1881/2006 EC规定限量为2 μg/kg,烟熏水产品为5 μg/kg^[3]。我国GB 2762—2005《食品污染物限量》规定限量为10 μg/kg^[4]。有关水(海)产品中苯并(a)芘测定方法主要有高效液相色谱荧光法^[5-6]、气相色谱-质谱法等^[5,7-9]。而3-羟基苯并芘[3-Hydroxybenzo(a)pyrene],简称3-OHBaP,是BaP在动物体内代谢和降解的主要产物,已有人提出将尿液中3-OHBaP作为人吸入和皮肤暴露BaP的生物标志物^[10-11]。

目前我国颁布的水产行业标准 SC/T 3042—

收稿日期:2013-01-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770724)

作者简介:刘晓晨 女 硕士生 研究方向为有机污染物与人体健康关系 E-mail:wbxzkq1@163.com

通信作者:李发胜 男 教授 研究方向为有机污染物与人体健康关系 E-mail:lfs920@sohu.com

2008《水产品中苯并(a)芘的测定 高效液相色谱法》^[12]检测水产品中 BaP 的方法存在步骤繁琐、操作时间长、试剂消耗大、对人员要求高等问题。本文在保证提取回收率前提下,对前处理方法尽量简化,操作相对简便,无需氮吹浓缩,建立了快速、准确地检测海产品中 BaP 和 3-OHBaP 的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

花蚬子,购于大连旅顺盐场海鲜市场。

1.1.2 仪器与试剂

Agilent1200 型高效液相色谱系统:配备四元泵、荧光检测器(FD)、自动进样器以及色谱处理工作站(美国安捷伦公司);

水为超纯水;乙腈、甲醇(色谱纯);二甲基亚砜(DMSO)(分析纯);BaP 标准品($\geq 98.5\%$,美国 Sigma 公司);3-OHBaP 标准品(100 mmol/L,美国国家癌症研究所惠赠);标准贮备液:准确称取 BaP 标准品 0.001 0 g,用 DMSO 溶解,定容于 50 ml 容量瓶中,配成 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准贮备液;取 3-OHBaP 标准品 10 μl ,用 DMSO 稀释,定容于 5 ml 容量瓶中,配成 0.2 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 的标准贮备液。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

花蚬去壳,取可食用部分用超纯水中洗净,滤纸吸干表面水分,绞碎混匀,称取试样 1 g(精确至 0.01 g)于 10 ml 匀浆器中,加入 2 ml 超纯水制成组织匀浆液。取上述匀浆液 100 μl ,加入 200 μl 乙腈,涡旋混合 10 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 20 μl 供高效液相色谱仪测定。

1.2.2 标准曲线的配制

配制浓度为 0.1、0.4、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 ng/ml 的 BaP 标准系列溶液、浓度为 0.004、0.02、0.04、0.08、0.16、0.24、0.32、0.40 nmol/ml 的 3-OHBaP($M = 268.32 \text{ g}/\text{mol}$)标准系列溶液,经换算则相当于浓度为 1.073、5.365、10.73、21.46、42.92、64.38、85.84、100.73 ng/ml 的 3-OHBaP 标准系列溶液。

1.2.3 添加试验

按照 1.1.2 方法处理后,分别添加 BaP 及 3-OHBaP 标准品 1.0、5.365 ng,做加标回收试验。

1.2.4 色谱条件

色谱柱:CenturySIL C₁₈-BDS(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm);BaP 流动相:甲醇-水(pH 4.5)(85:15),激发波长 265 nm,发射波长 450 nm;3-OHBaP 流动相:

甲醇-水(pH 4.5)(87:13),激发波长 365 nm,发射波长 450 nm;流速 1.0 ml/min;进样量 20 μl 。

2 结果与讨论

2.1 萃取剂的选择

BaP 的萃取溶剂主要有苯、环己烷、乙腈和丙酮等^[5-9]。苯的沸点低,挥发性大,易造成二次污染且对人体有害;环己烷提取回收率并不高,且操作繁琐;65% 乙腈提取 BaP、3-OHBaP 回收率较高,无需净化,操作简单,故本实验选用之。

2.2 提取条件的选择

超声波提取 5、10、20、30 min 后;涡旋混合延长放置时间 5、10、20、30 min、1 h 后以及改变放置温度(22 和 37 $^{\circ}\text{C}$),BaP、3-OHBaP 回收率没有增大,综合本实验确定 1.2.1 的提取方法。

2.3 流动相的确定

流动相中甲醇的比例对目标物质出峰位置有较大影响,甲醇比例过小,样品各色谱峰分离度较好,基线相对平稳,但延长了目标物的保留时间,分析操作费时;甲醇比例过大,出峰较快,缩短保留时间,但基线漂移较大且与样品中其它杂质峰发生重叠;在 0.5 ~ 2 ml/min 之间调整流速,过低会导致峰拖尾严重,太高又造成柱压过高,对色谱柱伤害较大;流动相 pH 值对色谱峰形状也有一定影响。

综合考虑上述因素,确定 1.2.4 中色谱条件,BaP、3-OHBaP 出峰时间合适,柱压不高且峰型较好(见图 1、2)。

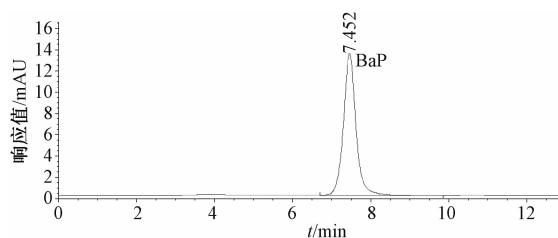


图 1(a) 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 苯并(a)芘标准品的色谱图
Figure 1(a) Standard chromatogram of BaP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

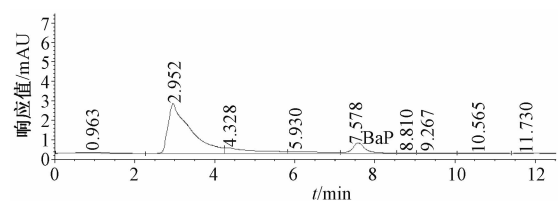


图 1(b) 花蚬样品的色谱图

Figure 1(b) Chromatogram of *Cyrenodonax termosana* sample

2.4 实验方法评价

2.4.1 线性关系和检出限

BaP、3-OHBaP 标准系列溶液按选定的色谱条

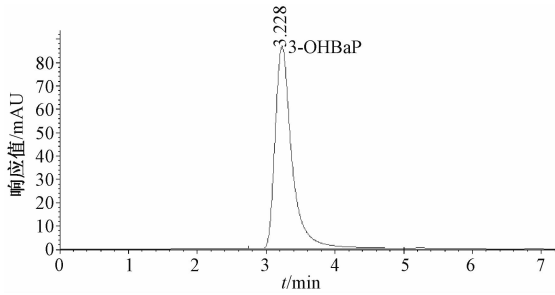


图2(a) 浓度为0.2 μmol/ml 3-羟基苯并芘标准品的色谱图
Figure 2(a) Standard chromatogram of 3-OHBP(0.2 μmol/ml)

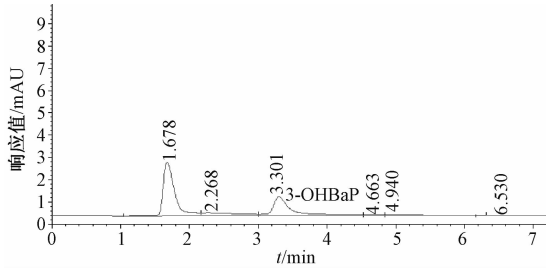


图2(b) 花鲈样品的色谱图

Figure 2(b) Chromatogram of *Cyrenodonax formosana* sample

件进行 HPLC 分析,以保留时间定性,以峰面积对浓度绘制工作曲线。结果表明,BaP 在 0.1 ~ 10.0 ng/ml 范围内,线性回归方程为 $y = 1.138x - 0.1972$,相关系数 $r = 0.9994$;3-OHBP 在 1.07 ~ 100.7 ng/ml 范围内,线性回归方程为 $y = 29.98x - 0.01226$,相关系数 $r = 0.9921$ 。以信噪比 $S/N = 3$ 求得 BaP、3-OHBP 检出限分别为 0.1 和 0.2 μg/kg。

2.4.2 回收率及精密度

本法检测花鲈体内 BaP 含量为 $(1.616 \pm 0.6040) \mu\text{g}/\text{kg}$;3-OHBP 含量为 $(4.596 \pm 2.072) \mu\text{g}/\text{kg}$ 。用加标后测得的含量扣除本底值,计算回收率(见表1);取一加标样品连续测定3天,第一天测5次,

表1 回收率实验结果($n = 5$)

Table 1 Results of recovery test($n = 5$)

	添加量 (ng)	结果量 (ng)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
BaP	1.0	1.120	112.0	101.9	6.0
		0.9680	96.8		
		0.9740	97.4		
		1.023	102.3		
		1.008	100.8		
3-OHBP	5.365	4.154	77.4	78.9	5.2
		3.897	72.6		
		4.470	83.3		
		4.358	81.2		
		4.299	80.1		

观察峰面积的变化情况,计算日内、日间相对标准偏差,BaP 分别为 3.2%、6.5%;3-OHBP 分别为 3.0%、5.2%。结果表明本方法回收率、精密度较好。

3 结论

采用 HPLC-FD 法检测海产品中 BaP、3-OHBP,样品预处理简单,分离效果好,灵敏度和准确度均较好,可用于海产品中 BaP 及其代谢产物 3-OHBP 的检测。

参考文献

- [1] Crystal R S, Salil K D, Aramandla R, et al. Benzo (a) pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat; role of oxidative stress[J]. J Appl Toxicol,2006,26:427-438.
- [2] 程元恺. 致癌性多环芳烃[M]. 北京:人民卫生出版社,1980.
- [3] Commission Regulation (EC). No. 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs[S]. 2006-09-19.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB 2762—2005 食品中污染物限量[S]. 北京:中国标准出版社,2005.
- [5] Won L, Hye S S, Jee E H, et al. Studies on the analysis of Benzo (a) pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatography/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry[J]. Bull Korean Chem Soc, 2003,24(5):560-563.
- [6] 黄鸾玉,黎小正,秦振发. 固相萃取/高效液相色谱-荧光法测定水产品中苯并芘[J]. 分析试验室,2009,28(12):63-66.
- [7] Jalal H, Abolfazl F. GC-MS determination of PAHs in fish samples following salting-out-assisted solvent extraction/gel permeation chromatography[J]. Chromatographia,2011,74:477-482.
- [8] 王建华,宫萍,田良良,等. 同位素稀释气相色谱串联质谱法测定海产品中的苯并(a)芘的残留量[J]. 化学分析计量,2012,21(1):24-26.
- [9] 吴敏,李政,黎翠玉,等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法联合测定食品中苯并(a)芘[J]. 食品安全质量检测学报,2012,3(2):82-88.
- [10] Leroyer A, Jeandel F, Maitre A, et al. 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo(a) pyrene as biomarkers of exposure to PAH in various environmental exposure situations[J]. Sci Total Environ, 2010,408(5):1166-1173.
- [11] Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, et al. A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a) pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a) pyrene in rats[J]. J Appl Toxicol,2010,30(5):402-410.
- [12] 中华人民共和国农业部. SC/T 3041—2008 水产品中苯并(a)芘的测定 高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2008.