

二阶导数恒能量同步荧光法快速测定 海产品中的苯并(a)芘

吴平平¹, 付东赛¹, 李秀英¹, 骆和东², 刘倩¹, 李呐^{1,2}, 李耀群¹

(1. 厦门大学化学化工学院化学系, 谱学分析与仪器教育部重点实验室, 福建厦门 361005)

(2. 厦门市疾病预防控制中心, 福建厦门 361005)

摘要: 海产品中的多环芳烃主要来自于水体污染, 而苯并(a)芘是公认的多环芳烃指标, 本文针对海产品中的苯并(a)芘含量的检测, 建立了简单快速的海产品中的苯并(a)芘含量的二阶导数恒能量同步荧光检测法。海产品样品经过微波辅助皂化萃取后, 正己烷萃取液被旋蒸干, 后再溶解于二氯甲烷溶液中, 以二阶导数恒能量同步荧光光谱法检测, 设定恒能量差为 1400 cm^{-1} , 扫描范围为 300~500 nm, 对其中的苯并(a)芘进行快速检测, 根据海产品样品的谱图特性, 用负峰-基线法读荧光强度值, 连续标准加入法进行定量分析, 整个光谱扫描所需时间只需 1 min。对实际样品检测回收率在 80.5%~118.2%之间, 检测限为 $0.10\text{ }\mu\text{g/kg}$, 定量限为 $0.34\text{ }\mu\text{g/kg}$, 线性范围为 0.34~250 $\mu\text{g/kg}$ 。对海产品样品的荧光检测结果与 HPLC-FL 检测结果基本一致, 对有证多环芳烃标准物质的检测结果与参考值一致。

关键词: 荧光法; 多环芳烃; 海产品

文章编号: 1673-9078(2014)5-297-300

Rapid Determination of Benzo(a)pyrene in Seafood by Second-derivative Constant-energy Synchronous Fluorescence Spectrometry

WU Ping-ping¹, FU Dong-sai¹, LI Xiu-ying¹, LUO He-dong², LIU Qian¹, LI Na^{1,2}, LI Yao-qun¹

(1. Department of Chemistry and the MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China) (2. Xiamen Center for Disease Control and Prevention, Xiamen 361021, China)

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seafood samples were ascribed to water pollution, while benzo(a)pyrene was recognized as an indicator of PAHs. A simple and rapid analytical method was developed by combining microwave-assisted pretreatment with second-derivative constant-energy synchronous fluorescence scanning technique for the determination of the benzo(a)pyrene content in seafood samples. The samples were firstly processed with microwave pretreatment, and the extractions were vaporized and redissolved into dichloromethane for further detection. According to the specific spectral properties of seafood samples, peak-to-derivative baseline measurement was used to read the fluorescence data, and standard addition method was applied to the quantitative analysis of seafood samples. The whole spectroscopic scan cost only 1 min. The recoveries ranged from 80.5% to 118.2% for seafood samples and the detection limit was $0.10\text{ }\mu\text{g/kg}$ with linear range from 0.34 to 250 $\mu\text{g/kg}$. The results obtained with this method were in consistence with those of HPLC-FL method. The satisfactory results acquired by using this method to analyze a certified reference material with a relative error of 7.1% from the certified benzo(a)pyrene concentration.

Key words: Fluorescence spectroscopy; polycyclic aromatic hydrocarbons; seafood

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, 简

收稿日期: 2013-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21375111, 21127005); 教育部博士点基金 (20110121110011)

作者简介: 吴平平 (1981-), 女, 硕士生, 中级实验师, 研究方向: 分析化学

通讯作者: 李耀群 (1964-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 分析化学

称 PAHs) 是指分子中含有两个或者两个以上苯环的化合物, 是最早被发现和研究的致癌类化合物之一, 它主要源于化石燃料和有机物质的不完全燃烧, 一些多环芳烃具有致癌、致畸、致突变“三致”毒性^[1]。苯并(a)芘是公认的多环芳烃存在的指标, 在中国国家卫生标准 GB 2762-2005^[2]中规定了苯并(a)芘在植物油中的限量为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$, 熏烤肉和粮食为 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。欧盟

规定^[3]婴儿食品(包括谷物类和奶制品类)中 BaP 的最大量为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 世界卫生组织和欧盟规定饮用水中苯并(a)芘的含量不能超过 10 ng/L , 国(GB 5749-2006)^[4]也对食品中苯并(a)芘的最大含量制定了相同的规定。海产品中多环芳烃的主要来源为水体的污染, 污染源包括原油泄漏, 陆地废水排放, 船舶污染等^[5]。对水体的污染间接地污染了鱼类、贝类和其他海洋生物^[6]。BaP 通过食物链在鱼类、植物和软体动物中发生生物蓄积, 造成海产品的 BaP 污染。因此, 加强对海产品中苯并(a)芘含量的监管是非常必要的。

现有海产品中多环芳烃检测方法大多为气相色谱-质谱法(GC/MS)、高效液相色谱-荧光法检测联用(HPLC-FL)等。这些方法虽有较强的分离分析的能力, 但对于复杂的食品样品, 由于组分间或基体的干扰, 常需加以预分离, 而色谱分离不仅费用昂贵, 同时操作也复杂和费时, 且由于载体的稀释作用, 也相对降低了灵敏度^[7]。微波萃取可显著地缩短样品处理时间和有机溶剂用量^[8]。恒能量同步荧光法通过选择合适的能量差, 能简化光谱、窄化谱带、减少散射光对检测的影响, 利用该技术, 可有效地减少样品前处理的步骤, 如净化步骤等, 解决多组分光谱重叠、不易分辨等问题。导数技术与恒能量同步荧光法联用能提高窄带的灵敏度, 进一步减小光谱重叠和散射光的影响, 而且使谱带特征更明显^[9-13]。

本研究建立了对海产品中苯并(a)芘的简单、低耗的快速检测方法。结合微波辅助皂化萃取技术, 采用导数恒能量同步荧光法, 并利用连续标准加入法定量, 实现对海产品中苯并(a)芘含量的快速检测。回收率在 80.6%~118.2%之间, 检测限为 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 远低于欧盟对食品中苯并(a)芘的限量标准(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 线性范围为 0.34-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对厦门市场上的海产品的恒能量差同步荧光法检测结果与 HPLC-FL 检测结果基本一致, 对有证标准物质检测结果与参考值一致。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

微波炉为格兰仕微波炉, G7020 II YSL-V1, 广东佛山; 离心沉淀机, 800 型, 上海公私合营鑫昌医疗器械厂; 所有光谱扫描均在实验室自制的多功能荧光分光光度计^[14]上实现。控制荧光仪的软件用 C 语言编写。该仪器配备 150 W 的氙灯光源, 激发、发射单色仪的光谱通带均为 5 nm, 激发和发射单色仪的扫描速度均设为 240 nm/min 。导数光谱由电子微分器可以直接获得, 校准曲线由标准加入法获得。光谱检测时使

用 1×1 cm 石英比色皿。

苯并(a)芘(BaP, 1×1 mL, ACET, 1000 mg/L, 正己烷), GBW(E)100130 海鲈鱼多环芳烃标准物质, 购自 Sigma-Aldrich 上海分公司; 正己烷、二氯甲烷(农残级, TEDIA Co. USA); 其余试剂均为分析纯, 购自上海国药试剂厂; 超纯水由 Milli-Q 水处理系统净化。

1.2 标准溶液配制

标准工作液是将苯并(a)芘储备液用正己烷逐级稀释到合适的浓度。所有溶液均在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境下保存。

1.3 试验方法

海产品样品购自厦门市场, 取其食用部分, 鱼去鳞取鱼肉, 虾去壳后取虾肉, 海蛎和文蛤等贝类均去壳后, 以食品搅拌机分别搅拌均匀, 放入冰箱冷藏待测。称取 1.0 g 海产品样品, 加入 100 mL 锥形瓶中, 加入 15 mL 1 M 的 MeOH-NaOH 皂化溶液, 以及 15 mL 正己烷微波皂化萃取, 微波功率为 140 W, 微波时间为 6 min, 冷却时间为 10 min, 取上层正己烷萃取液旋蒸后, 溶解于 5 mL 二氯甲烷溶液中, 以恒能量差 1400 cm^{-1} 二阶导数恒能量同步荧光法检测, 连续标准加入法定量。整个样品前处理和检测过程总时间仅需约 30 min。

2 结果与讨论

2.1 皂化、萃取条件的优化

正交实验法可以以极少的实验次数获得更多的信息, 通过方差分析选择最佳的实验条件, 有利于提高实验结果的准确性并大大节省萃取条件优化的考察时间。萃取效果的因素主要有: 萃取功率、萃取时间、溶剂体积与冷却时间等。由于实验采用为普通微波炉, 在微波功率大于最低可设置微波功率 140 W 时, 溶剂易爆沸造成损失, 因此微波功率采用 140 W。每个因素选择 3 个水平, 采用 $L_9(3^3)$ 正交表安排实验, 因素水平见表 1。

表 1 正交因素水平表

Table 1 Orthogonal factor level table

水平	萃取时间 /min	溶剂体积 /mL	冷却时间 /min
1	6	10	10
2	9	15	15
3	12	20	20

根据极差大小, 可判断因素的主次影响顺序。极

差 R 越大,表示该因素的水平变化对试验结果的影响越大,因素越重要。K₁、K₂、K₃分别为各因素的水平所对应的试验结果的平均值,由 K 值大小可以判断各因素优水平, K 值越大,相应的水平越佳。正交实验结果分析见表格 2。从表格 2 中极差分析可知,各种因素对海产品中 BaP 的提取效果影响的从大到小为:溶剂体积>萃取时间>冷却时间。那么,实验获得的最优萃取条件:萃取时间为 6 min,溶剂体积为 15 mL,冷却时间为 10 min。

表 2 正交实验极差分析结果

Table 2 Range analysis of the orthogonal experiment

因素	A(水平 萃取时间)	B(水平 溶剂体积)	C(水平 冷却时间)	苯并(a)芘含量 /(μg/kg)
实验 1	6	10	10	7.64
实验 2	6	15	15	8.14
实验 3	6	20	20	8.15
实验 4	9	10	15	5.95
实验 5	9	15	20	8.18
实验 6	9	20	10	7.28
实验 7	12	10	20	5.13
实验 8	12	15	10	7.56
实验 9	12	20	15	7.12
K ₁	7.98	6.24	7.49	
K ₂	7.14	7.96	7.07	
K ₃	6.60	7.52	7.15	
极差 R	1.37	1.72	0.42	
因素主 次顺序	溶剂体积>萃取时间>冷却时间			
优水平	6 min	15 mL	10 min	

2.2 海产品样品的恒能量同步荧光光谱图

按照优化好的方法对样品进行处理,所得到的海产品样品的谱图如图 1 所示。比较样品的恒能量差同步荧光光谱图和加标后的恒能量差同步荧光光谱图,样品中苯并(a)芘的荧光信号受到基体的干扰严重,同步荧光法在联合导数技术以后,基体的荧光信号被削弱,而苯并(a)芘的峰形更加突出,更有利于辨别,特别是

表 3 苯并(a)芘的线性方程及检出限

Table 3 Linear relationships, limits of detection and quantification of BaP

样品 名称	线性范围 /(μg/kg)	工作曲线 方程 ^a	相关系数 (r)	空白信号 (mean±SD ^b)	检出限 /(μg/kg)	定量限 /(μg/kg)
海产品	0.34~250	I=74.6C+17.8	0.9993	2.44±0.51	0.10	0.34

Note: a: I, Fluorescence intensity; C, concentration (μg/kg); b: SD, standard deviation.

2.4 实际样品加标回收率

当待测物低浓度时,更能将弱信号从复杂背景中区分开来。

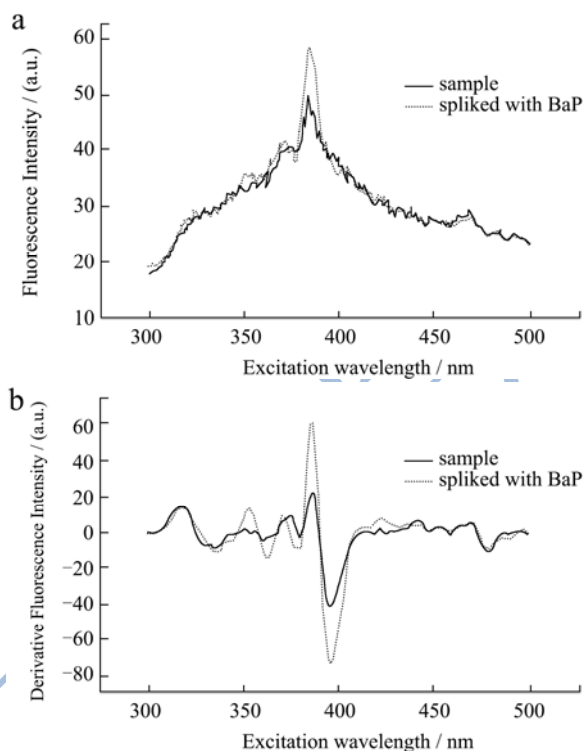


图 1 海产品样品以及加标(2.00 μg/kg BaP)样品零阶恒能量同步荧光光谱图(A)和二阶恒能量同步荧光光谱图(B)(恒能量差为 1400 cm⁻¹)

Fig.1 Constant-energy synchronous fluorescence spectra (A) and second-derivative constant-energy synchronous fluorescence spectra (B) of seafood sample (black line) and the sample spiked with 2.00 μg/kg BaP (red line) (Δν = 1400 cm⁻¹)

2.3 检测限与定量限

对样品空白(未检测出 BaP 的海产品样品作为样品空白)进行 11 次二阶导数同步荧光光谱检测,根据负峰基线法得到样品空白荧光强度的标准偏差,然后对样品空白进行连续标准加入,过程同对实际样品检测方法,得到标准加入工作曲线及线性拟合方程,以 3 倍空白样品的标准偏差除以工作曲线的斜率得到检测限。如表格 3 所示:海产品的检测限为 0.10 μg/kg,线性范围为 0.34~250 μg/kg。

针对不同样品,做了加标回收率考察,分别加入从低到高三个不同浓度的 BaP 标准溶液,按照前面建

立方法萃取，回收率见表格 4，回收率结果在 80.5%~118.2%之间，证明在所选择的实验条件下微波皂化萃取样品中的 BaP 结果令人满意。

表 4 实际样品中不同浓度的加标回收率

Table 4 Recoveries of BaP in seafood samples

样品	苯并(a)芘含量/(μg/kg)	加标量/(μg/kg)	测得量/(μg/kg)	回收率/%	平均回收率和标准偏差/%
海蛎	2.23	1	3.06	83.0	84.4±2.42
		5	6.38	83.0	
		10	10.95	87.2	
文蛤	2.45	5	7.20	95.0	92.5±3.64
		10	11.28	88.3	
		20	21.27	94.1	
鱼	1.31	2	3.46	107.5	102.1±19.4
		5	7.22	118.2	
		10	9.36	80.5	

为了验证方法的精密性，选用 6 份样品，进行了重现性的考察，结果如表格 5 所示，结果显示方法重现性的相对标准偏差为 2.5%，符合定量分析的要求。

表 5 方法重现性

Table 5 Method repeatability

编号	1	2	3	4	5	6	标准偏差
检测量/(μg/kg)	10.2	10.3	10.0	10.0	10.5	9.8	2.5%

2.5 与标准物质比对

为了进一步验证检测方法的准确度和精确度，平行称量三份 GBW(E)100130 海鲈鱼多环芳烃标准物质，在 140 W 微波功率下，微波萃取 6 min。海鲈鱼中 BaP 的测定值和参考值见表 5，结果显示，测定值与参考值基本接近。

2.6 与 HPLC 方法比对

表 6 海鲈鱼多环芳烃标准物质

Table 6 Detection of seabass PAHs standard material

样品编号	测得量/(μg/kg)	平均值/(μg/kg)	参考值/(μg/kg)
1	82.7		
2	85.0	83.6	90.0
3	83.0		

与 HPLC-FL 方法做对照，采用国家水产行业标准 SC/T3041-2008《水产品中苯并(a)芘的测定 高效液相色谱法》进行比对。比对数据见表 6。将两组数据做线性回归，相关系数为 0.997，证明两种方法所测量

得到的数据之间相关性良好，本研究所建立的方法可用于海产品中苯并(a)芘的快速检测。

表 7 导数恒能量同步荧光法与高效液相色谱法对照

Table 7 Comparison of DCESFS and HPLC-FL methods

样品	导数恒能量同步荧光法/(μg/kg)	高效液相色谱法/(μg/kg)
鱼样	0.26	0.68
加标鱼样 1	13.14	16.24
加标鱼样 2	112	110
文蛤	1.54	3.03
加标文蛤 1	35.92	38.57
加标文蛤 2	159	144
海蛎	2.34	1.83
加标海蛎	118	111

3 结论

针对海产品中苯并(a)芘的检测难题，本研究建立了用微波辅助皂化进行样品前处理，导数恒能量同步荧光光谱法进行含量检测的快速分析方法，方法的检测限低至 0.10 μg/kg。该法用于对实际样品的检测，与 HPLC-FL 法对比结果一致性良好，并且对于有证标准物质的检测，测定值与参考值一致，验证了方法的有效性。该方法简单、快速、低消耗而且灵敏度高，可实现海产品中苯并芘的常规快速筛查。

参考文献

- [1] Haritash A K, Kaushik C P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 169(1): 1-15
- [2] GB 2762-2005, 食品中污染物限量[S]
GB 2762-2005. Maximum levels of contaminants in foods [S]
- [3] Commission regulation (EC) No 1881 2006 of 19 decemer 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [S]
- [4] GB 5749-2006, 生活饮用水卫生标准[S]
GB 5749-2006. Standards for drinking water quality [S]
- [5] Rogowska J, Wolska L, Namieśnik J. Impacts of pollution derived from ship wrecks on the marine environment on the basis of s/s "Stuttgart"(Polish coast, Europe) [J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(23): 5775-5783
- [6] Qingzhao Li, Xian Zhang, Changzhou Yan. Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of recent sediments and marine organisms from xiamen bay, china [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, 58(3):

- 711-721
- [7] Marques A, Lourenço H M, Nunes M L, et al. New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood [J]. *Food Research International*, 2011, 44(2): 510-522
- [8] Pena T, Pensado L, Casais C, et al. Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1121(2): 163-169
- [9] Zhou N, Luo H D, Li N, et al. Highly sensitive and selective spectrofluorimetric approach for the rapid determination of trace benzo(a)pyrene in drinking water and in solutions leached from disposable paper cups [J]. *Luminescence*, 2011, 26(1): 35-43
- [10] Patra D, Mishra A K. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21(12): 787-798
- [11] Andrade-Eiroa Á, de-Armas G, Estela J M, et al. Critical approach to synchronous spectrofluorimetry. I [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29(8): 885-901
- [12] Andrade-Eiroa Á, de-Armas G, Estela J M, et al. Critical approach to synchronous spectrofluorimetry. II [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29(8): 902-927
- [13] Li N, Luo H D, Jia Y Z, et al. Rapid determination of benzo(a)pyrene in processed meat and fish samples by second-derivative constant-energy synchronous fluorescence spectrometry [J]. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & risk assessment*, 2011, 28(2): 235-242
- [14] Qun Li Y, Zhi Huang X, Gou Xu J, et al. Derivative constant-energy synchronous fluorescence for simultaneous analysis of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1992, 256(2): 285-291