

高效液相色谱-内标法测定香辛料中15种多环芳烃类污染物(PAHs)

侯美玲*, 冯桂蓉, 蔡小钦, 黄丹丹, 董宪兵

(重庆市食品药品检验检测研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(调味品监管技术), 重庆 401121)

摘要: 该研究建立了高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)同时分析香辛料中15种多环芳烃类污染物(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)含量的内标检测方法。样品经氢氧化钠溶解, 乙腈萃取, 正己烷复溶后, 过弗罗里硅土(Florisil)小柱净化浓缩, 供HPLC检测, 苯并[a]芘-B₁₂作为内标定量。该方法在0~100 ng/mL内线性关系良好, 辣椒中PAHs检出限: 0.5~3.0 μg/kg; 定量限 2.0~10.0 μg/kg; 花椒中检出限: 0.5~1.0 μg/kg; 定量限 2.0~3.0 μg/kg。在 2.0、10.0、50.0 μg/kg 3个浓度水平, 辣椒中回收率范围为 60.58%~119.48%, 相对标准偏差(Relative Standard Deviations, RSD)(n=6)为 1.25%~9.61%, 花椒中回收率为 60.46%~119.24%, RSD(n=6)为 1.10%~8.56%。5种地产香辛料中∑PAHs含量由高到低为: 青花椒(561.2 μg/kg) > 二荆条(448.8 μg/kg) > 红花椒(358.3 μg/kg) > 石柱红(353.6 μg/kg) > 小米辣(243.5 μg/kg), 区县种植基地污染较严重的为璧山、江津和荣昌, ∑PAHs分别为 721.5、626.6和 621.0 μg/kg, PAHs中污染较严重的化合物为菲、荧蒽和芘, 平均含量分别为 215.10、80.25和 75.35 μg/kg。该研究建立的内标法准确度高, 重复性好, 适用于香辛料及制品中PAHs检测。

关键词: 多环芳烃; 污染物; 内标法; 高效液相色谱; 香辛料

文章编号: 1673-9078(2024)04-331-340

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.4.0429

Determination of 15 Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Pollutants in Spices by an Internal Standard High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HOU Meiling*, FENG Guirong, CAI Xiaoqin, HUANG Dandan, DONG Xianbing

(Chongqing Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Condiment Supervision Technology for State Market Regulation, Chongqing 401121, China)

Abstract: An internal standard HPLC method was established for simultaneous determination of 15 kinds of PAHs in spices by. The samples were dissolved in sodium hydroxide, extracted with acetonitrile, redissolved by n-hexane, cleaned and concentrated by the Florisil SPE cartridge, and determined by HPLC, with benzo[a] pyrene D₁₂ being used as the internal standard. This method had a good linear relationship in the range of 0~100 ng/mL, with the detection limits of PAHs in *Capsicum* being 0.5~3.0 μg/kg and the limits of quantitation as 2.0~10.0 μg/kg. The limits of detection and limits of

引文格式:

侯美玲, 冯桂蓉, 蔡小钦, 等. 高效液相色谱-内标法测定香辛料中15种多环芳烃类污染物(PAHs) [J]. 现代食品科技, 2024, 40(4): 331-340.

HOU Meiling, FENG Guirong, CAI Xiaoqin, et al. Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in spices by an internal standard high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(4): 331-340.

收稿日期: 2023-04-10

基金项目: 重庆市市场监督管理局科研计划项目(CQSKJ2022006)

作者简介: 侯美玲(1987-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品加工过程中污染物检测, E-mail: meliny1986@126.com

quantitation of PAHs in *Zanthoxylum* were 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 2.0~3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. When the spiked levels were 2.0, 10.0 and 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the recoveries in the two spices were 60.58%~119.48% and 60.46%~119.24%, with the RSD ($n=6$) being 1.25%~9.61% and 1.10%~8.56%. The concentration of ΣPAHs in the five spices from high to low were: green *Zanthoxylum* (561.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > erjingtiao (448.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > red *Zanthoxylum* (358.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > shizuhongi (353.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > chilli (243.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The more seriously polluted areas of Chongqing were Bishan, Jiangjin and Rongchang, with ΣPAHs being 721.5, 626.6 and 621.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The more seriously polluted compounds in PAHs were phenanthrene, fluoranthrene and pyrene, with their average contents being 215.10, 80.25 and 75.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The internal standard method established in this study has high accuracy and good repeatability, which is suitable for the determination of PAHs in spices.

Key words: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs); pollutant; internal standard method; high performance liquid chromatography; spices

多环芳香族碳氢化合物 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 是一类具有“致畸、致癌、致突变”特性的环境污染物, 因其危害性较大, 美国环保署已将其中的 16 种列为监测重点对象, 欧盟食品安全局也对其中 8 种做了限量要求, 并选取了 4 种 (蒽、苯并 [a] 芘、苯并 [b] 荧蒹和苯并 [a] 蒽) 作为评价食品中 PAHs 污染的指标^[1]。我国现行污染物限量标准 (GB2762) 中对苯并 [a] 芘作了限量要求, 类别包括乳制品、谷物、肉类等, 与欧盟等国外标准相比, 无论品种还是限量, 目前均存在一定差距。目前对香辛料中多环芳烃的检测方法以及污染水平国内未见相关报道, 重庆作为香辛料盛产基地, 在全国调味品市场占有十分重要地位, 因此, 有必要建立香辛料中多环芳烃的检测方法, 对我市地产香辛料中多环芳烃污染状况及其生态防治研究具有重要意义。

多环芳烃检测方法中, 气相色谱质谱法和高效液相色谱法运用较广, 其中, 高效液相色谱法操作相对简单, 灵敏度高, 被广泛运用于地下水、熏烤肉制品、植物油等食品中多环芳烃的检测^[2,3]。前处理方面主要有固相萃取方法或者不同固相萃取小柱串联的方式^[4,5]、凝胶渗透色谱法^[6]、QuEChERS 法 (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)^[7]、超分子溶剂微萃取^[8,9]等技术。香辛料基质复杂, 内含色素、糖类、有机酸、甙等多种成分, 现行报道的检测方法大多数为有机溶剂提取, 外标法定量, 前处理对于香辛料类来说, 存在的难点为: 一是正己烷等脂溶性有机试剂提取目标物的同时也会将香辛料中油脂等杂质提取出来, 净化时会堵塞小柱, 净化效果不佳; 二是香辛料中色素等杂质未能去除, 上机前样品颜色太深, 容易堵塞仪器; 三是外标法定量, 目标物回收率太低, 数据重

现性不好。

本研究选取来自市内不同种植基地花椒 (青花椒、红花椒) 和辣椒 (二荆条、小米辣、石柱红) 样品, 建立了香辛料中多环芳烃污染的高效液相色谱-荧光检测器结合内标定量方法, 同时采用统计学方法对不同区县、不同品种的香辛料样品中多环芳烃污染水平进行分析, 以期对香辛料的食品安全科学监管, 以及评价其环境污染程度及生态风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣椒和花椒样品均来自市内各种种植基地, 详见表 1。

PAHs 混合标准溶液 (含萘 (Nap)、蒽 (Ace)、芴 (Flu)、菲 (Phe)、蒽 (Ant)、荧蒹 (Flu)、芘 (Pyr)、苯并 [a] 蒽 (BaA)、蒽 (Chr)、苯并 [b] 荧蒹 (BbF)、苯并 [k] 荧蒹 (BkF)、苯并 [a] 芘 (BaP)、茚并 [1,2,3-c,d] 芘 (Inp)、二苯并 [a,h] 蒽 (DahA) 和苯并 [g,h,i] 芘 (BghiP) (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 上海安谱实验科技股份有限公司; 苯并 [a] 芘标准溶液 -D₁₂ (BaP-D₁₂) (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 上海安谱实验科技股份有限公司。

C18 多环芳烃专用色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 上海安谱实验科技股份有限公司; 佛罗里硅土 (Florisil) 固相萃取小柱 (500 mg, 6 mL), 华谱生物科技 (重庆) 有限公司; QuEChERS 净化管 (2 mL), 华谱生物科技 (重庆) 有限公司; 高效液相色谱仪-荧光检测器 (U3000), 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司。

氢氧化钠溶液 (5 mol/L): 称取 20 g 氢氧化钠, 用水定容至 100 mL, 临用现配。

表 1 香料样品信息

样品编号	种类	种植基地	品种
H1~H3	花椒	璧山	青花椒
H4	花椒	江北	红花椒
H5	花椒	江北	青花椒
H6~H16	花椒	江津	青花椒
H17~H20	花椒	彭水	青花椒
H21~H24	花椒	彭水	红花椒
H25~H27	花椒	黔江	青花椒
H28~H29	花椒	黔江	红花椒
H31	花椒	巫山	红花椒
H32~H34	花椒	秀山	青花椒
H35	花椒	永川	青花椒
H36	花椒	酉阳	青花椒
H37~H39	花椒	长寿	红花椒
L1~L2	辣椒	北碚	小米辣
L3	辣椒	合川	二荆条
L4	辣椒	开州	二荆条
L5~L9	辣椒	彭水	二荆条
L10~L22	辣椒	石柱	石柱红
L23~L25	辣椒	巫山	小米辣
L26~L29	辣椒	秀山	二荆条
L30	辣椒	长寿	小米辣

1.2 样品前处理

提取：称取 1 g 试样于 50 mL 离心管中，加入 100 μ L BaP-D₁₂ 内标使用液 (100 ng/mL)，加入 5 mL 氢氧化钠溶液 (5 mol/L) 涡旋，超声 10 min，加入 10 mL 乙腈溶液，超声 30 min，5 000 r/min 离心，上层溶液于 30 °C 氮吹干，10 mL 正己烷溶解，待净化。

净化：Florisil 小柱依次用 3 mL 正己烷，3 mL 二氯甲烷活化，将正己烷溶解液转移至小柱中，流量控制 1 mL/min，待样液全部通过小柱后，依次用 5 mL 正己烷和 10 mL 二氯甲烷淋洗和洗脱，收集洗脱液于 30 °C 氮吹，乙腈定容至 1 mL，待测。

1.3 液相条件

流动相：A 乙腈和 B 水。

梯度洗脱时间：0~25 min, 40% A ; 25~35 min, 40% A~100% A ; 35~40 min, 100% A ; 40~45 min, 40% A。

流量：1.0 mL/min。柱温：30 °C。进样量：10 μ L。波长设置：见表 2。

表 2 多环芳烃的波长切换参数

Table 2 15th PAHs parameters of excitation wavelength and emission wavelength and switching time

时间/min	激发波长/nm	发射波长/nm
0.0	270	320
11.5	270	320
13.0	270	350
14.0	270	350
17.0	265	387
18.5	256	450
19.5	320	375
22.0	270	387
23.2	260	362
24.8	280	425
26.5	384	406
28.5	280	387
30.0	290	487

1.4 数据处理

采用 Dionex UltiMate 3000 的 Chromeleon 色谱管理系统软件计算样品含量，试验数据的统计分析用 SPSS 22.0 以及 Origin Pro 2022 进行。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的优化

多环芳烃属于非极性物质，常用提取溶剂有正己烷、石油醚、乙腈等^[10-12]，因正己烷极性较弱，根据相似相溶原理，选取正己烷当提取液，分别对阴性辣椒、花椒以及试剂空白进行同一质量浓度 (20 μ g/kg) 加标试验。实验发现，试剂空白和花椒样品中多环芳烃化合物能有效分开，响应较稳定，回收率分别在 81.40%~101.59%、74.06%~91.08% 范围内，辣椒中多环芳烃响应值明显下降，回收率在 3.22%~22.42% 之间，且杂质峰较多，影响目标物出峰。因辣椒中主要含有辣椒素，辣椒素极性与多环芳烃类似，且具有荧光性质^[13]，通过前期的实验摸索，我们推测辣椒素是影响辣椒中多环芳烃响应值的主要因素，因此，实验分别配制了含辣椒素与不含辣椒素的多环芳烃标准溶液进行对比 (图 1)。结果发现，含有辣椒素 200 ng/mL 的多环芳烃与不含辣椒素的多环芳烃响应值相差不大，但含有辣椒素 40 μ g/mL 的多环芳烃响应值仅为不含辣椒素的十分

之一，即多环芳烃响应值随着辣椒素浓度的升高而降低。辣椒素是辣椒的主要成分，不同辣椒的辣椒素含量虽不尽相同，但基本都在 mg/kg 以上，含量较高^[14]。有研究表明，辣椒素能抑制负责致癌多环芳烃代谢的芳香羟化酶，从而能够对多环芳烃诱导的癌症具有保护作用^[15]，这也可能是辣椒素影响多环芳烃的原因之一，但具体影响机制有待进一步研究。

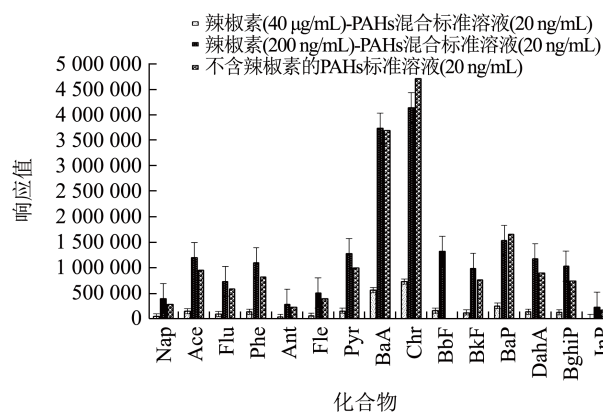


图1 添加不同浓度辣椒素的多环芳烃标准溶液响应值比较
Fig.1 Comparison fluorescent response of standard solution of polycyclic aromatic hydrocarbons containing different concentrations of capsaicin

辣椒素因含有酚羟基，能溶于碱性水溶液，碱水法目前在辣椒素的分离、纯化中运用较广泛^[16]，因此，本研究考虑采用氢氧化钠溶液去除辣椒素的干扰。分别对比了添加氢氧化钠和不添加氢氧化钠溶液的回收率（图2）。结果表明，加氢氧化钠的样品，多环芳烃回收率能提高1倍左右，提取效率大大提高。

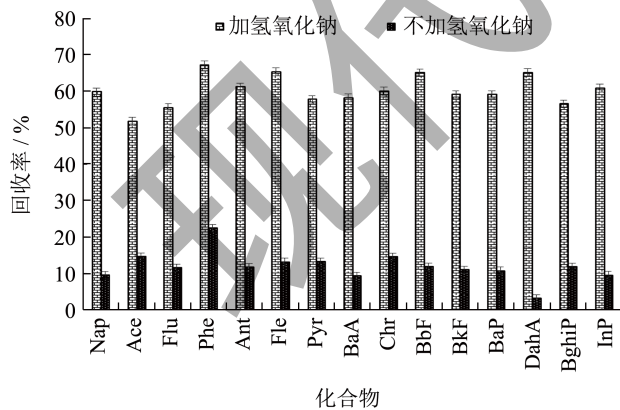


图2 加氢氧化钠和不加氢氧化钠的多环芳烃回收率对比
Fig.2 The recovery of adding sodium hydroxide and not adding sodium hydroxide

多环芳烃属于亲脂性化合物，水溶液中多环芳烃需用有机溶剂萃取，本文分别考察了乙腈、正己烷、丙酮、二氯甲烷提取效果。向阴性辣椒基质中加入

20 µg/kg 多环芳烃标准物质，比较提取效率。结果发现，4种试剂的回收率范围在42.26%~64.07%之间，各试剂间回收率差别不明显，但是丙酮和二氯甲烷提取液的颜色更深，后续较难净化，这可能是因为在一些脂溶性色素在丙酮和二氯甲烷中溶解性更好导致^[17]，其中二氯甲烷因密度大，目标物在下层，萃取不方便。乙腈和正己烷溶液去除色素效果更好，正己烷沸点较低，在后续超声及转移过程中容易挥发，综合分析，采用乙腈作为萃取溶剂。

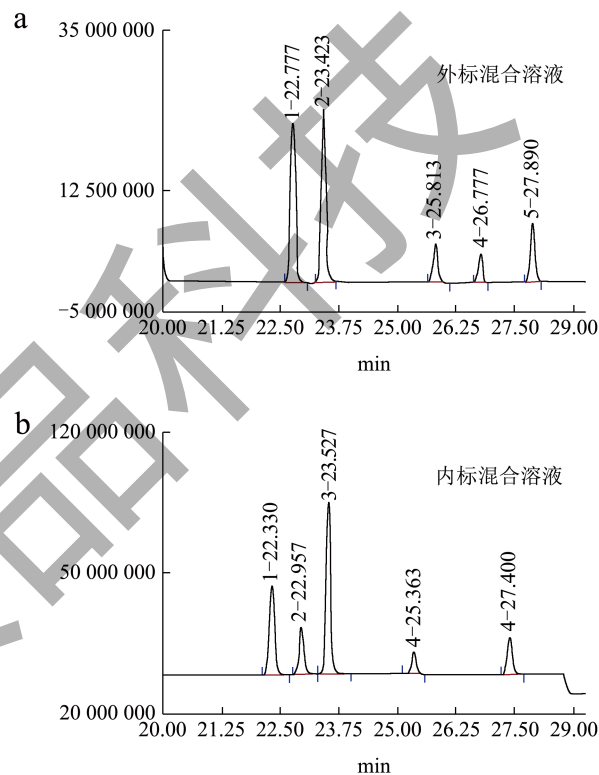


图3 多环芳烃内标溶液与外标溶液保留时间对比
Fig.3 Comparison of retention time between internal and external standard mixed solutions of PAHs

注：(a)1. BaA；2. Chr；3. BbF；4. BkF；5. BaP；
(b)1. BaA-D₁₂；2. Chr-D₁₂；3. BbF-D₁₂；4. BkF-D₁₂；5. BaP-D₁₂。

2.2 内标的选择

受杂质影响，辣椒中多环芳烃响应值较低，加入碱性溶液后回收率虽有所提高，但也仅在60%左右。为了提高数据的准确性，本文考虑使用内标对目标物进行校正。目前内标法一般与气相色谱-质谱法结合测定多环芳烃运用较多，如沙贤亮等^[18]、孙细珍等^[19]和钱雅慧等^[20]基于同位素内标分别建立了辣条、中药材以及土壤中多环芳烃测定方法，并取得了很好的效果，暂未有内标法与液相色谱法结合测定多环芳烃的报道。因辣椒中多环芳

烃的独特性，本文考虑使用跟多环芳烃性质类似的同位素化合物作为内标，主要难点是将同一种化合物与其同位素内标峰有效分开。实验分别配制了苯并[a]蒽-D₁₂ (BaA-D₁₂)、蒽-D₁₂ (Chr-D₁₂)、苯并[b]荧蒽-D₁₂ (BbF-D₁₂)、苯并[k]荧蒽-D₁₂ (BkF-D₁₂)、BaP-D₁₂ 共5种内标标准溶液进行上机测试，并分别与各自外标溶液出峰时间进行对比(图3)。实验发现：通过调节梯度，Chr-D₁₂与Chr以及BbF-D₁₂和BbF能有效分开，但Chr-D₁₂与BaA、BbF-D₁₂与Chr出峰时间相近，对目标物存在一定干扰。BaA-D₁₂与BaA、BkF-D₁₂与BkF以及BaP-D₁₂与BaP均能有效分开，适合作为内标，但个别品种辣椒在BaA-D₁₂出峰附近有杂质峰，难以区分，BaP-D₁₂比BkF-D₁₂响应值高很多，且出峰时间附近无其他干扰，综合分析，本文最终采用BaP-D₁₂作为内标物质。内标法与外标法处

理后的回收率见图4，从图中看出，加入内标校正后，15种多环芳烃化合物回收率均不同程度上升，回收率在62.70%~109.81%之间，能满足日常检测需求。

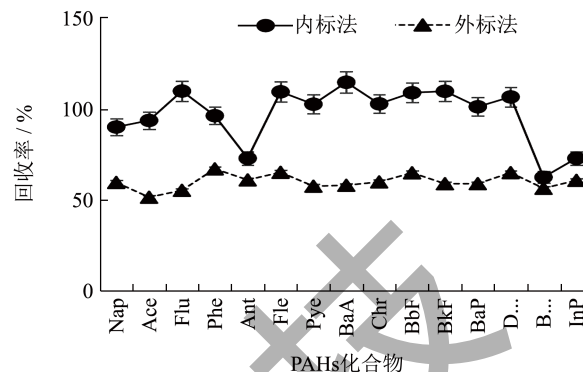


图4 内标法与外标法处理样品后回收率比较

Fig.4 Comparison of recoveries of samples pretreated by internal standard method and external standard method

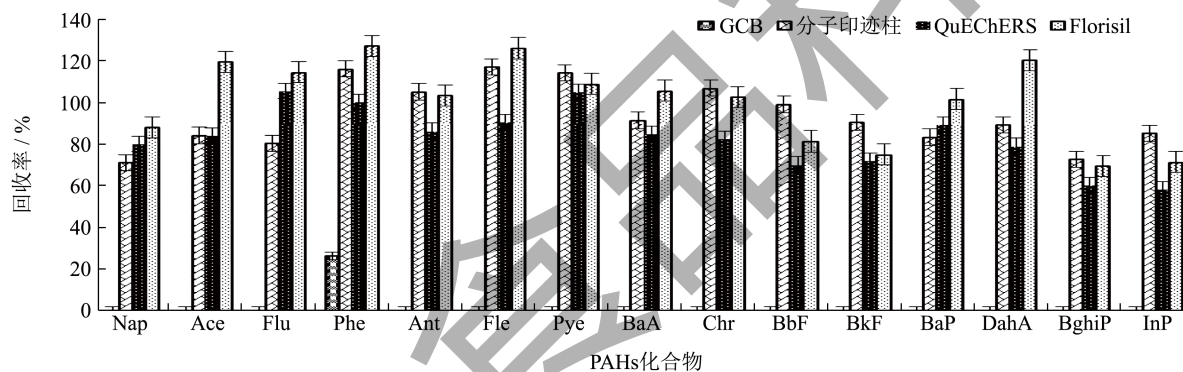


图5 4种净化方式处理辣椒中多环芳烃回收率比较

Fig.5 Comparison of recovery of 4th purification method effect on pepper

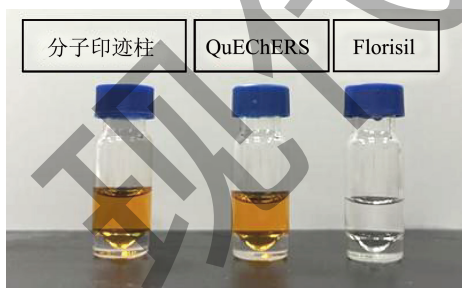


图6 分子印迹柱、QuEChERS和Florisil处理后的辣椒浓缩样品图

Fig.6 Concentrated chilli samples after processed by monolithic molecular imprinted, QuEChERS and Florisil

2.3 净化条件的优化选择

目前对多环芳烃净化处理大多数采用固相萃取、QuEChERS和超分子溶剂等方式，其中，超分子溶剂法对溶剂要求较高，适用性不强。对于富含脂质

和色素的食品，用固相萃取方式净化效果较好^[21-23]。本研究对比了4种小柱(石墨碳化黑(Graphite Carbide Black, GCB)、分子印迹柱、QuEChERS和Florisil)对辣椒中多环芳烃的净化效果，如图5所示。

实验结果表明，GCB小柱使目标物损失较大。GCB带有芳香性的正六元环平面分子结构，能吸附平面环状目标物，而多环芳烃大多数种类都具有平面环状结构，如萘、菲、芘等，因此GCB虽对吸附辣椒色素具有良好效果，但同时也造成目标物损失，这与陈玲等^[24]的研究结果相似。Florisil、分子印迹柱以及QuEChERS方法回收率相差不大，其中，分子印迹柱除色效果不佳，对辣椒基质中多环芳烃的吸附特异性表现不强，且上样时流动性差，净化效果不理想；QuEChERS方法虽前处理简单，但对色素净化效果不明显，而Florisil小柱不仅能

吸附色素, 除去部分极性物质, 使样液保持透明澄清状态, 同时回收率也能满足实验要求, Florisil、

分子印迹柱以及 QuEChERS 处理的样液见图 6。综合考虑, 本研究最终选择 Florisil 小柱。

表 3 15种PAHs方法学参数

Table 3 Methodological parameters of 15th PAHs

化合物	保留时间/min	线性方程	相关系数 (r)	检出限/(μg/kg)		定量限/(μg/kg)	
				辣椒粉	花椒粉	辣椒粉	花椒粉
Nap	12.26	y=0.079 3x+0.063 3	0.999 5	1.0	0.5	3.0	2.0
Ace	15.17	y=0.213 4x+0.208 3	0.999 6	2.0	1.0	6.0	3.0
Flu	15.55	y=0.125 6x+0.113 2	0.999 5	1.0	0.5	3.0	2.0
Phe	16.74	y=0.171 4x+0.256 5	0.999 4	1.0	0.5	3.0	2.0
Ant	17.83	y=0.045 6x+0.019 4	0.998 6	2.0	0.5	6.0	2.0
Fle	19.13	y=0.084 1x+0.066 0	0.999 1	1.0	0.5	3.0	2.0
Pyr	20.11	y=0.317 4x+0.434 9	0.998 7	0.5	0.5	2.0	2.0
BaA	22.92	y=1.384 3x+1.964 2	0.997 4	0.5	0.5	2.0	2.0
Chr	23.56	y=1.549 3x+2.232 5	0.997 7	0.5	0.5	2.0	2.0
BbF	25.97	y=0.341 9x+0.334 7	0.999 8	0.5	0.5	2.0	2.0
BkF	26.93	y=0.260 9x+0.347 0	0.998 8	1.0	0.5	3.0	2.0
BaP	28.05	y=0.549 1x+0.591 4	0.999 0	0.5	0.5	2.0	2.0
DahA	29.29	y=0.301 0x+0.185 2	0.999 5	1.0	1.0	3.0	3.0
BghiP	30.80	y=0.021 0x+0.000 2	0.996 4	3.0	1.0	10.0	3.0
InP	31.34	y=0.057 7x-0.080 3	0.996 6	2.5	1.0	8.0	3.0

表 4 辣椒中多环芳烃回收率和RSD

Table 4 Recovery and relative standard deviation of PAHs in *Capsicum* (n=6)

化合物名称	2.0 μg/kg		10.0 μg/kg		50.0 μg/kg	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
Nap	92.30	4.07	97.06	3.87	87.29	5.70
Ace	92.78	7.18	88.36	1.61	96.24	4.02
Flu	111.09	2.63	112.85	1.68	96.10	3.71
Phe	99.32	5.26	104.55	5.48	106.39	5.92
Ant	78.03	8.38	80.05	6.14	76.76	5.38
Fle	109.38	6.69	95.35	2.08	86.34	5.19
Pyr	101.38	6.73	119.48	1.25	108.43	5.48
BaA	114.88	3.42	110.29	4.64	114.86	3.72
Chr	101.81	7.67	110.51	2.45	100.92	6.28
BbF	111.42	7.88	105.26	4.05	99.84	7.91
BkF	107.65	3.04	99.13	2.02	86.22	6.24
BaP	104.75	5.03	86.68	2.01	85.93	5.34
DahA	101.56	8.62	79.19	2.32	77.21	7.36
BghiP	61.55	6.01	63.20	7.20	67.44	1.35
InP	70.31	9.61	61.72	7.10	60.58	3.08

表 5 花椒粉中多环芳烃回收率和RSD

Table 5 Recovery and relative standard deviation of PAHs in *Zanthoxylum* (n=6)

化合物名称	2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
Nap	92.32	6.07	98.81	1.73	85.63	3.21
Ace	95.77	4.45	87.53	1.27	96.38	2.42
Flu	109.08	3.41	113.60	1.28	96.61	4.29
Phe	95.29	6.77	108.56	4.02	107.24	7.82
Ant	72.58	7.03	76.86	3.79	78.78	1.14
Fle	106.49	6.08	97.87	5.33	85.37	6.13
Pyr	104.19	4.25	119.24	1.37	112.73	6.84
BaA	115.31	3.17	113.40	4.94	116.09	1.10
Chr	103.06	4.86	109.64	1.76	118.09	3.73
BbF	105.52	6.35	107.72	4.67	111.61	3.55
BkF	110.98	7.18	97.93	1.97	84.35	3.99
BaP	104.27	4.41	86.50	5.11	88.26	1.41
DahA	102.86	5.39	78.26	1.83	75.75	5.90
BghiP	63.29	8.48	60.46	7.87	67.57	1.99
InP	71.07	8.56	60.95	8.05	61.01	2.43

2.4 方法学验证

配制质量浓度为 0~100 ng/mL 的 PAHs 系列标准溶液 (含 BaP-D₁₂ 10 ng/mL), 以标准物质的浓度 (x) 为横坐标, PAHs 峰面积与内标峰面积的比值 (y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果显示 15 种 PAHs 呈良好线性, 相关系数 (r) 在 0.996 4~0.999 6 之间。分别向空白辣椒和花椒中添加一定浓度的标准溶液, 以 3 倍、10 倍信噪比确定方法检出限和定量限, 辣椒中检出限: 0.5~3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 定量限 2.0~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 花椒中检出限: 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 定量限 2.0~3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 详见表 3。

分别向空白辣椒和花椒中添加 2.0、10.0 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度水平的标准溶液, 按照 1.2 前处理步骤每个水平做 6 个平行试验, 结果见表 4 和表 5, 得到辣椒粉中回收率范围为 60.58%~119.48%, RSD 为 1.25%~9.61%。花椒粉中回收率范围为 60.46%~119.24%, RSD 为 1.10%~8.56%。

以添加浓度水平、化合物以及品种为固定因子, 回收率为因变量, 进行了多因素方差分析, 对不同数据间进行事后多重比较, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标准。结果显示, 不同浓度水平以及化合物间回收率有显著差异 ($P < 0.05$), 而品种间差别不大 ($P = 0.133$)。

2.5 地产香辛料中多环芳烃污染水平

采用所建立的方法对我市种植基地的 69 批次样品进行了测定 (含辣椒 30 批次, 花椒 39 批次), 包括二荆条、石柱红、小米辣和青花椒、红花椒 5 个品种, 多环芳烃总量 (\sum PAHs) 检出值从大到小依次为: 青花椒 (561.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > 二荆条 (448.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > 红花椒 (358.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > 石柱红 (353.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) > 小米辣 (243.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。不同品种中多环芳烃检出含量差别较大, 其中, Nap、BghiP 和 InP 检出率较低, 仅在二荆条和青花椒中检出, 石柱红和小米辣均未检出这三种物质; Ace、BkF、BaP、DahA 平均含量均低于 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Phe、Fle、Pyr 检出率较高, 且都是各品种中检出值较高的化合物, Phe 的平均检出值最高, 范围为 170.8~243.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Fle 的平均值范围为 28.3~83.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; Pyr 的平均值范围为 21.7~118.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 各种植区县中, 璧山、江津、荣昌、黔江受多环芳烃污染较严重, \sum PAHs 检出值在 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上。详见图 7 和图 8。将样品检测结果进行方差分析, 得出 $F = 6.022$, $P < 0.05$ 。其中, 产地、品种和化合物均 $P < 0.05$, 说明不同产地、不同品种、不同化合物间均具有显著差异, 产地与化合物之间交互作用不明显, 详见表 6。

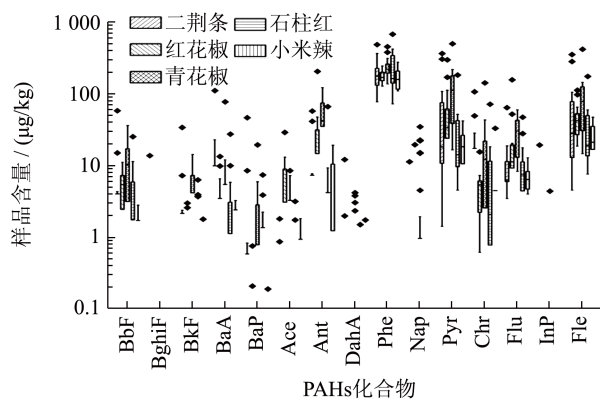


图 7 5 种香辛料中多环芳烃污染水平

Fig.7 Contamination levels of 15 kinds of PAHs in 5 kinds of spices (µg/kg)

近年来,国内外对 PAHs 在种植土壤、地下水、蔬菜等介质中的残留、分布及特征等进行了大量研究。如 Agarwal 等^[25]分析了印度德里各个农场表层土壤中 16 种 PAHs 范围在 830~3 880 µg/kg 之间,并且市区浓度均高于农村;杨国义等^[26]研究表明珠江三角洲典型区域农业土壤中 16 种 PAHs 的平均含量 24 412 µg/kg 且以三环和四环的 PAHs 为主;龙明华等^[27]检测出南宁市不同区域 5 种蔬菜的

∑ PAHs 含量范围在 140.62~741.06 µg/kg; 也有少量报道表明香辛料在加工过程中容易受到多环芳烃污染,如 Rozentale 等^[28]研究发现,经由干燥后的大部分干香料(黑胡椒、辣椒粉和肉豆蔻)和香草(小叶薄荷、罗勒和百里香)样品的 PAH4 含量增加至 1.0~25.8 µg/kg; Fasano 等^[29]测得西班牙烟熏辣椒粉中的 10 种 PAHs,范围从 5 332 µg/kg 到 18 118 µg/kg,主要为是荧蒽和芘,与本研究结果相似。

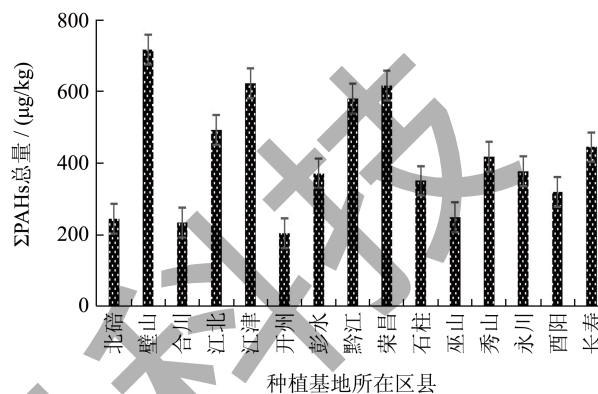


图 8 不同种植区县香辛料中 ∑PAHs 检出值

Fig.8 Distribution total content of 15 kinds of PAHs in different districts of Chongqing spices materials (µg/kg)

表 6 样品方差分析

Table 6 Variance analysis of samples

源	III 类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	3 280 975.959a	179	18 329.475	9.35	0
截距	540 620.378	1	540 620.378	275.771	0
产地	60 466.884	9	6 718.543	3.427	0
品种	9 439.721	1	9 439.721	4.815	0.029
化合物	1 835 115.628	14	131 079.688	66.864	0
产地 * 品种	933.959	1	933.959	0.476	0.49
产地 * 化合物	207 371.028	126	1 645.802	0.84	0.89
品种 * 化合物	25 898.681	14	1 849.906	0.944	0.511
产地 * 品种 * 化合物	10 710.741	14	765.053	0.39	0.978
误差	1 470 295.548	750	1 960.394		
总计	5 596 863.244	930			
修正后总计	4 751 271.508	929			

$R_a^2=0.691$ (调整后 $R_{adj}^2=0.617$)

注:因变量:检测值。*产地:各区县种植基地;品种:香辛料的种类;化合物:15种多环芳烃。

3 结论

本研究采用氢氧化钠-乙腈作为提取液,经正己烷复溶后,采用弗罗里硅土固相萃取小柱富集除杂,用苯并[a]芘-D₁₂对目标物进行定量,建立了香辛料中多环芳烃的高效液相色谱方法。与之前的研究方法相比,本文创新性的采用内标与液相结合的方式,提高了检测效率,适用于含香辛料基质的食品中PAHs的检测。另外,本文对我市地产辣椒和花椒样品中多环芳烃含量水平进行了检测,发现我市不同种植基地以及不同香辛料品种均不同程度受到多环芳烃污染,下一步可对不同香辛料、不同种植区域、不同种植土壤等研究,以探究其影响因素、产生来源及暴露风险评估等。

参考文献

- [1] STUPPNER S, HUSSAIN S, MARK B, et al. An automated preloaded pipet tip SPE method for the accurate quantification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons from tea [J]. *Analytical Methods*, 2020, 12: 1827-1833.
- [2] GUO F, RAO Z, ZHAN N, et al. An automatic and sensitive method for simultaneous determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons and four derivatives by online solid-phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography with online solvent filtration [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(43): 7721-7730.
- [3] CHIANG C F, HSU K C, CHO C Y, et al. Comparison and establishment of appropriate methods to determine EU priority PAHs in charcoal-grilled chicken drumsticks with different treatments and their dietary risk assessments [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 142(8): 111400.
- [4] BARP L, MORET S, PURCARO G. Monitoring and occurrence of heavy PAHs in pomace oil supply chain using a double-step solid-phase purification and HPLC-FLD determination [J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2737.
- [5] SUN M, WANG X, DING Y, et al. Titania hybridized melamine-formaldehyde aerogel for online in-tube solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons prior to HPLC-DAD [J]. *Microchimica Acta*, 2022, 189(12): 456.
- [6] ZHAO Y, HU K, YANG C, et al. Covalent organic framework@Ti3C2Tx composite as solid phase microextraction coating for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey samples [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1237(2): 340581.
- [7] CHIANG C F, HSU K C, TSAI T Y, et al. Evaluation of optimal QuEChERS conditions of various food matrices for rapid determination of EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons in various foods [J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127471.
- [8] FALSAFI Z, RAOFIE F, ARIYA P, et al. Supercritical fluid extraction followed by supramolecular solvent microextraction as a fast and efficient preconcentration method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in apple peels [J]. *Journal of Separation Science*, 2020, 43(6): 1154-1163.
- [9] DUENASMAS J, BALLESTEROS GOMEZ A, RUBIO S. Characterization of a new sustainable supramolecular solvent and application to the determination of oxy-PAHs in meat, seafood and fish tissues [J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134731.
- [10] 赵佳莹,李晓敏,卢晓华,等.高效液相色谱-荧光检测法测定橄榄油中4种多环芳烃[J].*色谱*,2017,35(7):748-754.
- [11] WILL C, DAGNONIHUELSMANN R, CRISTINADA CUNHA H, et al. Improvement of dispersive liquid-liquid microextraction robustness by performing consecutive extractions: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian sugar cane spirits by GCMS [J]. *Separation Science Plus*, 2018, 1(8): 564-573.
- [12] AVTFOUNI S, MREIS R, KAMIKATAK, et al. Furlani. Polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS and HPLC-FLD [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2018, 11(2): 146-152.
- [13] 林佳璐,徐贞贞,廖小军,等.辣椒红色素提取、纯化方法研究进展[J].*中国果菜*,2020,40(9):28-35.
- [14] 杨笋.辣椒中辣椒素类物质和营养品质及相关酶活性变化规律的研究[D].雅安:四川农业大学,2020.
- [15] ANANDAKUMAR P, KAMARAJ S, RAMAKRISHNAN G, et al. Chemopreventive task capsaicin against benzo (a) pyrene induced lung cancer in Swiss albino mice [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2009, 104 (5): 360-365.
- [16] 徐婉淇,张婷婷,施纤红,等.辣椒碱提取工艺和药理作用的研究进展[J].*食品安全导刊*, 2022,5:183-186.
- [17] 周武先,段媛媛,卢超,等.高效提取3种不同类型植物叶片色素的方法[J].*西北农业学报*,2019,28(1):97-104.
- [18] 沙贤亮,吴平谷,秦延平,等.同位素内标结合真空浓缩气相色谱-质谱法测定辣条中4种多环芳烃标志物[J].*卫生研究*,2020,49(4):603-607,612.
- [19] 孙细珍,杜佳炜,钱全全,等.气相色谱-质谱法检测益智药材中16种多环芳烃[J].*分析测试学报*,2021,40(5):732-739.
- [20] 钱雅慧,汪婷,洪秀萍,等.煤矿区地表土中烷基多环芳烃的定量方法研究[J].*质谱学报*,2022,43(2):168-177.
- [21] RUMSFIELDAJ, WESTP D. Topical capsaicin in dermatological properties pain disorders [J]. *Annals of Pharmacotherapy*, 1991, 25(4): 381-387.
- [22] HELENA DA-COSTA-MORAIS E, HOLLINGWORTH COLLINS C, JARDIM I. Pesticide determination in sweet

- peppers using QuEChERS and LC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2018, 249:77-83.
- [23] ABUL K M M I, HYO S L, JINHO R, et al. Application of high-surface-area graphitized carbon black with primary secondary amine as an alternative quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe cleanup material for pesticide multi-residue analysis in spinach [J]. Journal of Separation Science, 2019, 42(14): 2379-2389.
- [24] 陈玲,刘霜霜,王锡兰,等.QuEChERS技术净化材料在果蔬农药残留检测中的应用进展[J].食品安全质量检测学报,2023,14(3):1-9.
- [25] AGARWAL T, KHILLARE P S, SHRIDHAR V, et al. Pattern, sources and toxic potential of PAHs in the agricultural soils of Delhi, India [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(2-3): 1033-1039.
- [26] 杨国义,张天彬,高淑涛,等.珠江三角洲典型区域农业土壤中多环芳烃的含量分布特征及其污染来源[J].环境科学,2007,10:2350-2354.
- [27] 龙明华,龙彪,唐璇,等.南宁市不同区域五种蔬菜的多环芳烃含量分析[J].北方园艺,2018,5:7-14.
- [28] ROZENTALE I, LUN A Y, ZACS D, et al. The occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in dried herbs and spices [J]. Food Control, 2018, 83: 45-53.
- [29] FASANO E, YEBRA P I, MARTINEZ C, et al. Profiling, distribution and levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in traditional smoked plant and animal foods [J]. Food Control, 2016, 59: 581-590.