

固相萃取-液相色谱-荧光检测法测定半夏中 苯并[a]芘残留量

何强*, 张璐, 李莹, 孔祥虹, 李建华, 邹阳, 付骋宇

(陕西出入境检验检疫局, 西安 710068)

摘要: **目的** 建立半夏样品中苯并[a]芘残留量的固相萃取-液相色谱-荧光检测法。**方法** 样品用水浸泡后, 用正己烷萃取, 硅胶固相萃取柱和 ENV 固相萃取柱净化, 分析时采用 SUPELCO SIL™ LC-PAH(25 cm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱分离, 以乙腈-水(85:15=V:V) 为流动相, 荧光检测激发波长 384 nm, 发射波长 406 nm, 外标法定量。**结果** 苯并[a]芘的检出限为 0.1 μg/kg, 在 1.0~50.0 ng/mL 浓度范围内, 苯并[a]芘的线性相关系数为 0.9999, 线性关系良好, 方法回收率在 78.0%~102.5% 范围内, 相对标准偏差低于 9.6%。**结论** 该方法准确、实用、简便、快速, 在中药材的苯并[a]芘残留量检测方面有广泛应用前景。

关键词: 固相萃取; 液相色谱-荧光检测法; 半夏; 苯并[a]芘; 中药材

Determination of benzo[a]pyrene residues in *Pinellia ternata* using solid phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection

HE Qiang*, ZHANG Lu, LI Ying, KONG Xiang-Hong, LI Jian-Hua, ZOU Yang, FU Cheng-Yu

(Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of benzo[a]pyrene residues in *Pinellia ternata* by solid phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection method. **Methods** The samples were soaked with water and extracted with *n*-hexane, then cleaned up with silica gel solid phase extraction column and ENV solid phase extraction column. The sample was performed on a SUPELCO SIL™ LC-PAH (25 cm×4.6 mm, 5 μm) column by using mobile phase acetonitrile/water 85:15 (V:V). A fluorescence detector was operated at excitation/emission wavelength 384/406 nm. Quantitation analysis was carried out with the external standard method. **Results** The detection limit of benzo[a]pyrene was 0.1 μg/kg and the correlation coefficient had a linearity in the range of 1.0~50.0 ng/mL ($r=0.9999$). The recoveries ranged from 78.0% to 102.5% with relative standard deviations less than 9.6%. **Conclusion** The method is accurate, practical, simple and fast, and has extensive application prospect for determination of benzo[a]pyrene residues in Chinese herbal medicine.

KEY WORDS: solid phase extraction; liquid chromatography with fluorescence detection; *Pinellia ternata*; benzo[a]pyrene; Chinese herbal medicine

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2014IK128)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of General Administration of Quality Supervision and Quarantine of the People's Republic of China (2014IK128)

*通讯作者: 何强, 高级工程师, 主要从事食品安全检测技术研究。E-mail: heq@snciq.gov.cn

*Corresponding author: HE Qiang, Senior Engineer, Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.10, Hanguang North Road, Xi'an 710068, China. E-mail: heq@snciq.gov.cn

1 引 言

半夏是一种常用中药材, 而苯并[a]芘是一种高活性致癌、致畸、致突变物质, 对人类身体健康有极大的危害。大气、水体、土壤均是苯并[a]芘的污染载体, 环境污染产生的苯并[a]芘会迁移到半夏药材中, 另外, 半夏在加工储存过程中也有可能产生苯并[a]芘。韩国规定除矿物性韩药材(中药材)外的全部韩药材中苯并芘限量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而美国、欧盟、日本、中国均未对中药材中的苯并[a]芘限量做出明确规定, 但参考食品中的限量, 普遍均为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我们检测的半夏样品中苯并[a]芘有超过 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的, 存在安全风险, 有必要研究建立快速、有效、实用的检测方法, 以加强质量安全控制。

目前苯并[a]芘的检测方法主要有液相色谱-荧光检测法^[1-5]、气相色谱-质谱法^[6-8]、气相色谱-串联质谱法^[9,10]、液相色谱-串联质谱法^[11,12], 但中药材中苯并[a]芘检测方法较少, 半夏中苯并[a]芘的检测尚未见到有文献报道。本研究通过对半夏等中药材中苯并[a]芘检测方法的考察, 建立一种快速、准确、简便、实用的标准化液相色谱-荧光检测方法。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪, 配荧光检测器(美国 Waters 公司); DT 1028CH 型超声提取仪(德国 Bandelin 公司); HS 501 型振荡器(德国 IKA 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 3-18K 离心机(德国 Sigma 公司); 正己烷、二氯甲烷和乙腈(均为液相色谱级, 美国 Merck 公司); 超纯水(由 Milli-Q 超纯水仪制备); Bond Elut Si 固相萃取柱和 Bond Elut ENV 固相萃取柱(均为 500 mg/6 mL, Agilent 公司); 苯并[a]芘标准品(纯度大于 99.3 %, 美国 Supelco 公司); 将苯并[a]芘用乙腈溶解配制成 100 mg/L 的标准储备液, 使用时用乙腈逐级稀释。

2.2 液相色谱测定条件

色谱柱: SUPELCOSIL™ LC-PAH 色谱柱(25 cm \times 4.6 mm, 5 μm , Supelco 公司); 流动相: 乙腈-水(85:15=V:V)等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; 激发波长: 384 nm; 发射波长: 406 nm。

2.3 样品提取与净化

将半夏样品高速粉碎, 过 60 m 筛, 称取 2 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 水, 超声浸泡 30 min, 加入 15 mL 正己烷, 振荡提取 10 min, 4000 r/min 离心 3 min, 取上层正己烷溶液于 100 mL 浓缩瓶中, 用 15 mL、15 mL 正己烷再重复萃取 2 次, 合并正己烷萃取液, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至约 5 mL。

将 Bond Elut Si 固相萃取柱串接在 Bond Elut ENV 固相萃取柱上方, 依次用 5 mL 二氯甲烷、10 mL 正己烷活化, 取样品溶液上样, 并用约 5 mL 正己烷洗涤样品浓缩瓶, 洗涤液合并上样, 再用 15 mL 正己烷淋洗, 弃去硅胶固相萃取柱, 用 5 mL 正己烷淋洗 Bond Elut ENV 固相萃取柱, 最后用 5 mL 正己烷-二氯甲烷溶液(3:1=V:V)洗脱, 整个净化过程保持流速 2~3 mL/min, 收集洗脱液, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至近干, 加入 1.00 mL 乙腈溶解定容, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 供液相色谱-荧光检测法检测。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理

3.1.1 提取条件优化

通过预实验对浸泡方式和萃取次数进行了优化, 取含有苯并[a]芘的半夏样品, 比较了静态浸泡 30 min 和超声浸泡 30 min 的差别。在同等条件下, 超声浸泡比静态浸泡的测定结果高 8% 左右, 可能是由于超声能够使苯并[a]芘从半夏中更多的游离出来, 提高了萃取效率。使用正己烷萃取时, 每次用 15 mL, 萃取 2 次的萃取率已达到 85% 以上, 萃取 3 次已基本萃取完全。

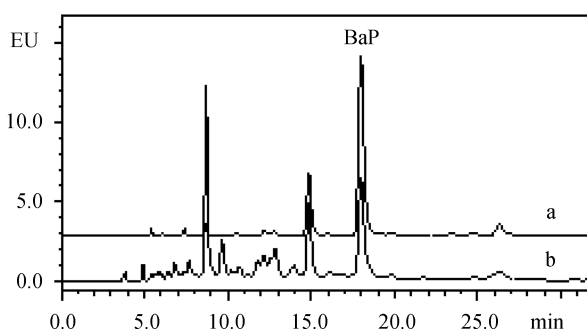
3.1.2 净化条件优化

苯并[a]芘的净化方法主要有固相萃取法、凝胶渗透色谱法等, 其中凝胶渗透法耗时、耗溶剂, 而且需要专用装置。从便于方法推广应用的出发, 重点对固相萃取净化方法进行了考察, 实验中比较了佛罗里硅土固相萃取柱、佛罗里硅土固相萃取柱串联 Bond Elut ENV 固相萃取柱、硅胶固相萃取柱串联 Bond Elut ENV 固相萃取柱三种净化方式。其中佛罗里硅土固相萃取柱需要收集上样流出液(正己烷溶液)及洗脱液(正己烷-二氯甲烷(3:1, V:V)), 去除的主要是一些极性较大的杂质, 对低极性杂质不能有效去除。而佛罗里硅土固相萃取柱串联 Bond Elut ENV 固

相萃取柱、硅胶固相萃取柱串联 Bond Elut ENV 固相萃取柱可以利用 Bond Elut ENV 固相萃取柱对苯并[a]芘的吸附特性,净化时可以弃去正己烷淋洗液,可以有效去除油脂及脂溶性色素等低极性杂质。由于弗罗里硅土对苯并[a]芘的吸附强于硅胶,需要用正己烷-二氯甲烷(3:1=V:V)才能完全洗脱,而硅胶固相萃取柱用正己烷即可有效洗脱, Bond Elut ENV 固相萃取柱仅可有效吸附正己烷中的苯并[a]芘,最终选择硅胶固相萃取柱和 Bond Elut ENV 固相萃取柱组合使用达到最佳的净化效果,确定了“2.3”中的净化过程。

3.2 液相色谱检测条件优化

采用液相色谱-荧光检测时,主要研究了流动相条件、荧光激发波长和发射波长。对检测中流动相的比例进行了考察,以95%、85%、80%的乙腈-水作为流动相时的情况,95%的比例时出峰太早,与杂质峰的分离不好;80%的比例时出峰时间约25 min,出峰时间偏晚;而85%乙腈-水时,苯并[a]芘出峰时间约18 min,与干扰峰能很好的分离,因此选择85%的乙腈-水为流动相。苯并[a]芘的两种荧光检测结果如图1所示,激发波长384 nm、发射波长406 nm时的色谱响应值及样品抗干扰性均明显优于激发波长297 nm、发射波长408 nm,色谱响应值提高约80%,而且样品杂峰明显减少或降低。



a: $\lambda_{ex}=384$ nm and $\lambda_{em}=406$ nm; b: $\lambda_{ex}=297$ nm and $\lambda_{em}=408$ nm
图1 不同荧光检测条件下半夏样品的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Pinellia ternata* sample in different fluorescence detection

3.3 线性关系与检出限

配制1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng/mL的苯并[a]芘系列标准溶液,按“2.2”的液相色谱条件进样检测,并以苯并[a]芘标准浓度(X , ng/mL)为横坐标,

峰面积(Y)为纵坐标作图,同时用最小二乘法进行线性回归,得标准曲线回归方程为 $Y=127565X-10078$,线性相关系数 r 为 0.9999,线性关系良好。

将含有苯并[a]芘的样品溶液稀释进样,苯并[a]芘样品溶液的最低检出浓度($S/N=3$)为 0.2 $\mu\text{g/L}$,根据样品前处理方法换算,本方法的检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.4 室内加标回收率实验

取经测定苯并[a]芘含量为 0.75 $\mu\text{g/kg}$ 的半夏为加标基质,添加 1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/kg}$ 3个水平,每个加标水平 8个平行样品,半夏样品及加标水平为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 样品的色谱图如图2所示,回收率及精密度数据如表1所示,加标回收率在 78.0%~102.5%范围内,相对标准偏差小于 9.6%,满足痕量检测要求。

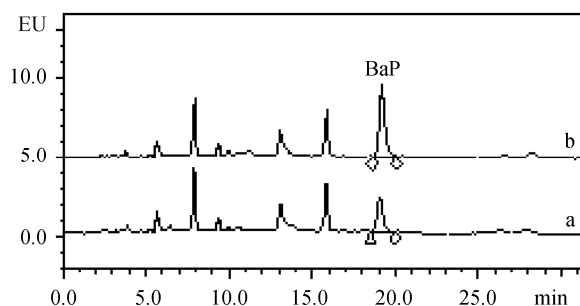


图2 半夏样品及加标水平为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 样品的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of *Pinellia ternata* sample(a) and sample spiked with 1.0 $\mu\text{g/kg}$ standard(b)

表1 回收率及精密度测定结果($n=8$)
Table 1 Results of recoveries and precisions ($n=8$)

本底含量 /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	加标量 /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 $r/\%$	平均回收率 /%	RSD /%
	1.0	78.0~101.0	87.6	8.6
0.75	2.0	78.5~102.5	89.8	9.6
	5.0	80.0~100.2	91.1	7.6

3.5 方法应用

利用本研究建立的检测方法对 11 批市售的半夏样品进行了检测,其中 8 批检出不同含量的苯并[a]芘,含量分别为 0.40、0.75、1.1、3.2、3.9、4.7、5.6、6.5 $\mu\text{g/kg}$,说明苯并[a]芘在半夏中存在较为普遍。同时利用建立的检测方法对地黄、人参、黄芪、甘草、

番泻叶、苦杏仁、绞股蓝、蜂胶、茯苓、僵蚕等中药材样品进行了检测, 回收率及重现性均能满足检测要求。

4 结 论

由于我国对中药材中苯并(a)芘尚无明确的限量规定, 监管比较薄弱, 研究中也发现一些中药材中苯并[a]芘含量较高, 存在一定的安全风险。韩国等国家早已制定了中药材中苯并[a]芘的限量, 随着社会的发展, 我国也一定会加强对中药材中苯并[a]芘残留量的关注, 通过检测可以了解我国中药材中苯并[a]芘残留量情况, 为检验监管提供技术手段, 保障人们的用药安全, 也可以促进我国中药材的对外贸易。本研究建立的半夏中苯并[a]芘检测方法快速、简便、准确、实用, 应用门槛低, 便于推广, 适用于多种中药材检测, 应用范围广。

参考文献

- [1] 林埔, 梁一池, 胡娟. 固相萃取/高效液相色谱荧光法测定珊瑚中苯并[a]芘残留[J]. 分析测试学报, 2015, 34(6): 711-714.
Lin P, Liang YC, Hu J. Determination of benzo[a]pyrene in *Sarcandra galbra* by solid phase extraction/high performance liquid chromatography with fluorescence detector [J]. J Instrum Anal, 2015, 34(6): 711-714.
- [2] 杨悠悠, 王浩, 刘佟, 等. 分散式固相萃取结合高效液相色谱法快速测定油脂制品中苯并(a)芘[J]. 分析化学, 2014, 42(9): 1387-1388.
Yang YY, Wang H, Liu T, et al. Determination of Benzo(a)pyrene residues in edible oil and oil products by high performance liquid chromatography with dispersive solid phase extraction [J]. Chin J Anal Chem, 2014, 42(9): 1387-1388.
- [3] 何强, 孔祥虹, 李建华, 等. 采用新型固相萃取柱快速测定食用植物油中苯并[a]芘[J]. 分析测试学报, 2012, 31(6): 710 ~ 714.
He Q, Kong XH, Li JH, et al. Rapid determination of benzo[a]pyrene in edible vegetable oil using a new type of solid phase extraction column [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(6): 710-714.
- [4] Mária S, Jana S, Božena S, et al. Application of accelerated solvent extraction for simultaneous isolation and pre-cleaning up procedure during determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products [J]. Food Anal Meth, 2015, 8(4): 1014-1020.
- [5] Svetlana NS, Galina KV, Tatjana MM, et al. New method for benzo[a]pyrene analysis in plant material using subcritical water extraction [J]. J Geochem Explor, 2014, 144(Part B): 267-272.
- [6] 毕鸿亮, 张浩原, 孙翠香, 等. 蔬菜中多环芳烃的 GC-MS 分析[J]. 分析测试学报, 2007, 26(4): 530-532.
Bi HL, Zhang HY, Sun CX, et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in vegetable by gas chromatography-mass spectrometry with saponification clean-up [J]. J Instrum Anal, 2007, 26(4): 530-532.
- [7] 王建华, 郭翠, 庞国芳, 等. GPC 净化-同位素稀释内标定量 GC-MS 对植物油中多环芳烃的测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(3): 267-271.
Wang JH, Guo C, Pang GF, et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) in vegetable oil samples by gel permeation chromatography purification-gas chromatography-mass spectrometry based on an isotope dilution approach [J]. J Instrum Anal, 2009, 28(3): 267-271.
- [8] 薛海全, 崔兆杰, 杜世勇, 等. 加速溶剂萃取/气相色谱-质谱法测定小麦中多环芳烃[J]. 中国环境监测, 2011, 27(3): 42-46.
Xue HQ, Cui ZJ, Du SY, et al. Determination of PAHs in wheat by accelerated solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Environ Monit China, 2011, 27(3): 42-46.
- [9] 曾浩, 汤桦, 陈大舟, 等. 同位素稀释三重串联四级杆质谱法测定鱼组织中 24 种多环芳烃[J]. 分析实验室, 2011, 30(9): 11-16.
Zeng H, Tang H, Chen DZ, et al. Determination of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons in fish tissue by isotope dilution GC-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30(9): 11-16.
- [10] 薄海波. 加速溶剂萃取-气相色谱-三重四级杆串联质谱法测定地黄中苯并芘[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(12): 2119-2122.
Bo HB. Determination and confirmation of benzopyrene in Chinese herbal medicines *rehmanniae radix* and *rehmanniae radix praeparata* by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Chin J Pharm Anal, 2013, 33(12): 2119-2122.
- [11] 王浩, 杨红梅, 郭启雷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定植物油中苯并芘与黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂[J]. 分析测试学报, 2014, 33(8): 911-916.
Wang H, Yang HM, Guo QL, et al. Simultaneous determination of benzo(a)pyrene and Aflatoxins(B₁, B₂, G₁, G₂) in vegetable oil by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(8): 911-916.
- [12] Rozanna A, Robin N, Christoffer B, et al. Determination of hy-

droxylated polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC-photoionization tandem mass spectrometry in wood smoke particles and soil samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(16): 4523–4534.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



何 强, 高级工程师, 主要从事食品安全检测技术研究。
E-mail: heq@snciq.gov.cn

“食源性致病微生物”专题征稿

食源性致病微生物的危害一直是食品安全关注的焦点之一, 微生物污染造成的食源性疾病是世界食品安全中最突出的问题。常见的食源性致病微生物主要包括细菌、病毒、寄生虫等, 食源性病原体的种类仍在增加, 对食品安全以及人类自身健康已经构成了不容忽视的威胁。

鉴于此, 本刊特别策划了“食源性致病微生物”专题, 由江南大学的王周平教授担任专题主编, 王教授现任江南大学食品学院副院长, 国家食品药品监督管理局首批餐饮服务食品安全专家, 江苏省食品安全标准审评专家, 无锡出入境检验检疫局特约研究员, 无锡市食品药品监督管理局保健食品安全专家, 江苏省食品科学与技术学会秘书长。

专题主要围绕**食源性致病微生物的研究进展、快速检测和溯源、新技术在检测中的应用、危险性评估、监测分析**等或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2016 年 1 月份出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及王周平教授特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2015 年 12 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

Email: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部