

徐志华, 朱晓华, 葛筱琴, 等. 自动索氏抽提-凝胶渗透色谱-气相色谱/质谱法测定渔业养殖环境及水产品中 16 种多环芳烃残留量[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1459-1467.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.027

自动索氏抽提-凝胶渗透色谱-气相色谱/质谱法测定 渔业养殖环境及水产品中 16 种多环芳烃残留量

徐志华^{1,2}, 朱晓华^{1,2}, 葛筱琴^{1,2}, 耿雪冰^{1,2}, 刘崇万^{1,2}, 沈美芳^{1,2}

(1. 江苏省淡水水产研究所, 南京 210017; 2. 江苏省水产质量检测中心/农业农村部渔业产品质量监督检验测试中心(南京), 南京 210017)

摘要: 本研究通过不同溶剂索氏提取和凝胶渗透色谱(GPC)净化条件的比较研究,建立了基于自动索氏抽提-凝胶渗透色谱(GPC)-气相色谱/质谱法同时测定渔业养殖环境中养殖水(直接溶剂萃取,无需索氏抽提)、底泥及草鱼、罗氏沼虾、中华绒螯蟹等水产品中 16 种多环芳烃(PAHs)残留量的方法。样品中的多环芳烃由环己烷:丙酮(体积比1:1)、环己烷:二氯甲烷(体积比1:1)、丙酮:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂索氏提取,经 GPC 净化后,通过 DB35-MS 毛细管色谱柱分离,采用电子轰击源选择反应监测模式进行质谱分析,以内标法定量。结果显示,16 种渔业养殖环境平均检出限为 0.017~0.171 $\mu\text{g}/\text{kg}$,测定下限为 0.051 $\mu\text{g}/\text{kg}$,底泥的加标回收率达到 52.4%~110.7%,相对标准偏差为 0.64%~8.94%,养殖用水的加标回收率达到 74.1%~116.7%,相对标准偏差为 0.52%~8.91%,水产品的加标回收率达到 70.3%~126.4%,相对标准偏差为 0.14%~8.91%。表明本研究方法满足渔业养殖环境(养殖用水、底泥)及水产品中 PAHs 的含量测定。

关键词: 渔业养殖环境; 水产品; 多环芳烃; 气相色谱质谱法; 凝胶渗透色谱

中图分类号: TS254.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1459-09

Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons residues in aquaculture environment and aquatic products by automated Soxhlet extraction-gel permeation chromatography-gas chromatography/mass spectrometry method

XU Zhi-hua^{1,2}, ZHU Xiao-hua^{1,2}, GE Xiao-qin^{1,2}, GENG Xue-bing^{1,2}, LIU Chong-wan^{1,2}, SHEN Mei-fang^{1,2}

(1. Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 2. Fishery Analysis & Testing Center of Jiangsu Province / Quality Control & Inspection Center for Domestic Fishery Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs(Nanjing), Nanjing 210017, China)

Abstract: Based on automatic Soxhlet extraction-gel permeation chromatography (GPC)-gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), a method has been developed for the determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in aquaculture water, sediment and aquatic products (grass carp, *Macrobrachium rosenbergii*, *Eriocheir sinensis*) by comparing different Solvent soxhlet extraction and GPC purification conditions. In addition, the aquaculture water was extracted

directly by solvent without Soxhlet extraction. The sample were extracted in automated Soxhlet extraction with cyclohexane: acetone (volume ratio 1:1), cyclohexane: methylene chloride (volume ratio 1:1), and acetone: methylene chloride (volume ratio 1:1) after injecting into GPC to purifying. The purified samples were separated by DB35-MS capillary chromatographic column. The electron

收稿日期: 2019-03-07

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设专项(JFRS-05); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(18)2011]

作者简介: 徐志华(1985-), 女, 江苏连云港人, 硕士, 中级工程师, 主要从事水产品质量安全检测与研究。(E-mail) 243188769@qq.com

通讯作者: 朱晓华, (E-mail) xhz824@sina.com

bombardment source selection reaction monitoring model was used for mass spectrometry analysis, and internal standard method was used for quantitative analysis. The result showed that the average detection limit of 16 PAHs in aquaculture environments ranged from 0.017 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 0.171 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the lower limit of measurement was 0.051 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average spiked recovery rates of sedimen were in the range of 52.4%–110.7%, and the relative standard deviation was in the range of 0.64%–8.94%. The average spiked recovery rates of aquaculture water were in the range of 74.1%–116.7%, the relative standard deviation was in the range of 0.52%–8.91%. The average spiked recovery rates of aquatic products were in the range of 70.3%–126.4%, and the relative standard deviation was in the range of 0.14%–8.91%, respectively. The method could be used for the determination of PAHs residues in aquaculture environment (including water and mud) and aquatic products.

Key words: aquaculture environment; aquatic product; polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); gas chromatography/mass spectrometry; gel permeation chromatography

多环芳烃 (PAHs) 是一类具有致癌、致畸以及能够诱导有机体突变的环境有机污染物^[1-3]。目前已知的 PAHs 约有 200 种^[4], 其主要来源为有机物 (煤炭、石油等) 在高温下不完全燃烧而产生, 广泛存在于大气、土壤、水体中。其中 16 种 PAHs 由于存在显著的致癌、致畸作用, 被美国 EPA (Environmental protection agency) 认为是优先监测污染物^[5-6]。水体环境中的 PAHs 可通过水体、食物、沉积物等途径进入鱼、虾、蟹等水生生物体内, 有文献显示, 国内许多水域受到不用程度的污染, 其中长江流域水体中的 PAHs 含量明显高于其他水域^[7], 因此近年来农业农村部将多环芳烃作为水产养殖环境及产品长期质量安全风险隐患排查的监控项目。但是在限量规定上, 中国与国外还有所差距, 《食品安全国家标准——食品中污染物限量》中规定, 水产品在多环芳烃的限量指标设置上仅以苯并^[a]芘的残留量作为评价指标, 限量标准为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而欧盟是以 4 种多环芳烃污染物的总含量作为评价多环芳烃污染的一个指标, 限量标准为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (双壳贝类为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[8]。

目前, 渔业环境及水产品中多环芳烃的检测方法主要有液相色谱-紫外荧光法^[9]、气相色谱-质谱法^[10]。液相色谱法利用其共轭结构具有荧光特性, 以乙腈-水为流动相分离 16 种 PAHs, 优点是用时短, 分离效果较好^[8], 但由于水产品中 PAHs 浓度低 (痕量级或超痕量级), 且基质复杂 (基质含有蛋白质、脂肪、色素等多种干扰物质), 该法净化后的样品仍然存在明显的脂肪, 且目标组分回收率偏低^[11]。气相色谱-质谱法在定性和灵敏度具有优势, 且抗基质干扰能力强, 但在分析低挥发性的 PAHs 方面有局限性^[12-13]。常用的渔业环境与水产品中多环芳烃检测样品前处理方法很容易受基体的干扰, 因此如何对样

品进行有效提取、净化和浓缩是分析工作的重点。目前渔业环境及产品多环芳烃的提取方法主要有索氏提取法、超声波提取法、超临界流体萃取等^[14], 每种提取方法各有优劣, 采取传统的索氏抽提法提取较为充分, 缺点是步骤繁琐, 溶剂消耗量大。超声波提取法、加速溶剂提取法具有方便快捷、溶剂用量少的优点, 但对样品的沸点有选择性, 超声波提取对高沸点化合物提取效果好, 超临界萃取法对低沸点化合物提取效果好^[15], 但仪器价格高。

本研究以渔业养殖环境中养殖用水、底泥及水产品 (草鱼、罗氏沼虾、中华绒螯蟹等) 作为研究对象, 对自动索氏抽提条件 (养殖水直接溶剂萃取, 无需索氏抽提) 与凝胶渗透色谱 (GPC) 净化方法进行深入比较试验, 建立气相色谱/质谱联用法检测多环芳烃。与传统的前处理方法相比, 自动索氏抽提避免了试验过程中多次更换溶剂的繁琐操作, 且明显减少了溶剂使用量^[16]; 凝胶渗透色谱 (GPC) 以样品中各组分在凝胶中滞留时间不同而达到分离的目的, 在对样品进行净化时, 具有全自动化、耗时短、成本低和安全系数高等优点^[17], 可有效解决渔业环境样品和水产品基质复杂的问题, 从而实现简单统一的批量化预处理, 为渔业养殖水域与水产品开展相关风险监测与评估提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 仪器与设备

Agilent7890A/5975C 气质联用仪 (美国 Agilent 公司产品), GPC-ULTR GPC 凝胶净化浓缩系统 (德国 LC tech 公司产品), R-81 脂肪测定仪 (瑞士布奇公司产品), R-200 旋转蒸发仪 (瑞士布奇公司产品); AllegraTM 21R 台式高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司产品), XW-80A 微型涡旋混合仪 (上

海沪西分析仪器厂产品), Elix 5+Milli-Q Academic 纯水仪(美国 Millipore 公司产品), AE200 电子天平(感量0.000 1 g, 瑞士梅特勒-托利多公司产品), JY5002 电子天平(感量 0.01 g, 上海精天电子仪器厂产品), N-EVAPTM111 氮吹仪(美国 Organomation 公司产品), KQ250B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司产品), Turbovap II 全自动浓缩工作站(英国 Caliper 公司产品)。

1.2 药品与试剂

16 种 PAHs 混合标准品 200.0 mg/L(农业农村部环境保护科研监测所, Lot:311778), 内标茈-d12 4.0 mg/L(美国 Accustandard 公司产品)、内标茈-d 10 4.0 mg/L(美国 Accustandard 公司产品)、内标菲-d 12 0.2 mg/L(美国 Accustandard 公司产品)、内标蒽-d 12 4.0 mg/L(美国 Accustandard 公司产品), 环己烷、正己烷、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司产品), 氢氧化钾(分析纯, 南京化学试剂有限公司产品)。

1.3 样品及其制备

底泥沉积物风干磨碎, 经过 0.5 mm 径的筛孔过滤后封装, 室温保存; 养殖用水样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后收集密封 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存; 渔业产品选用草鱼、罗氏沼虾、中华绒螯蟹为样品, 具有代表性, 也是重点监测品种, 鱼取肌肉部分, 虾去壳, 取肉, 蟹去壳去鳃取可食部分, 用高速万能试样粉碎机打成匀浆, 置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻贮存, 测定前将其室温解冻供前处理用。

1.4 样品前处理

底泥: 取预处理好的土样 10.0 g 放入滤纸筒内, 加入内标使用液, 向抽提器内倒入 100 ml 环己烷: 丙酮(体积比1:1)混合溶剂, 加热等级 7 级, 时间 2 h, 合并抽提液, 将冷至室温的抽提液转移至 250 ml 圆底烧瓶中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至 1 ml, 将提取液用环己烷: 乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂定容至 10.0 ml, 进行 GPC 净化, 收集流出液 1 ml, 供 GC-MS 检测。

水样: PAHs 对光比较敏感, 采集后, 可放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏箱中储存。量取 1 000 ml 水样加入 30 g NaCl 于烧杯中, 加入 50 ml 环己烷: 二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂, 超声波提取 30 min, 过滤, 重复提取 1 次, 合并滤液。在滤液中加入无水硫酸钠 10 g, 过滤, 滤液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴上旋转蒸发浓缩, 将

提取液加入内标使用液定容至 1 ml, 供 GC-MS 检测。若水样较为浑浊, 将浓缩液用环己烷: 乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂定容至 10 ml, 进行 GPC 净化, 收集流出液 1 ml, 供 GC-MS 检测。

水产品: 准确称取混合均匀的样品 5.00 g 放入滤纸筒内, 加入内标使用液, 向抽提器内倒入 100 ml 环己烷: 二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂加热等级 10 级, 时间 2 h, 将冷至室温的抽提液移至 250 ml 圆底烧瓶中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至 1 ml, 用环己烷: 乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂定容至 10.0 ml, 进行 GPC 净化, 收集流出液 1 ml, 供 GC-MS 检测。

1.5 标准溶液

使用正己烷稀释 PAHs 混合标准溶液与内标标准溶液, 配制成内标标准溶液质量浓度均为 500 $\mu\text{g/L}$ 含 16 种 PAHs, 标准工作溶液质量浓度分别为 5 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、250 $\mu\text{g/L}$ 、500 $\mu\text{g/L}$ 、750 $\mu\text{g/L}$ 、1 000 $\mu\text{g/L}$ 。

1.6 GPC 设定条件

TACS TM 系统 TACS TM 参数: 油浴温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 流动相流速 5.0 ml/min, 样品定量环 5 ml, 前运行时间 1 140 s, 主运行时间 2 000 s, 后运行时间 120 s, 真空阶段一: 170 mbar, 真空阶段二: 210 mbar, 后运行时间 120 s。

1.7 仪器工作条件

色谱条件: DB35-MS (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), 进样口温度 260 $^{\circ}\text{C}$, 载气为 99.999% 高纯氮气, 不分流进样, 进样量 1 μl , 流量 1.0 ml/min; 柱升温程序: 初始温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 190 $^{\circ}\text{C}$, 保持 1 min, 以 25.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 200 $^{\circ}\text{C}$, 以 5.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 230 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min, 以 2.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 250 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min, 以 2.0 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min, 以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 310 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min。

质谱条件: EI 源, 离子源温度: 260 $^{\circ}\text{C}$, 四级杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$, 传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 选择离子检测 (SIM) 模式。各种 PAHs 及内标物的定性、定量离子见表 1。

2 结果与分析

2.1 色谱分离情况

16 种 PAHs 标准溶液总离子流图见图 1。16 种 PAHs 和 4 种内标物缩写、定量及定性离子及保留

时间参见表1。

波峰上的数字1~20表示出峰顺序,分别为萘、蒽烯、内标物蒽-D10、蒽、芴、菲、内标物菲-D10、蒽、荧蒽、芘、苯并(a)蒽、内标物蒽-D12、蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、苯并(a)芘、内标物芘-D12、茚酚(1,2,3-cd)芘、二苯并(a,h)蒽、苯并(g,h,i)芘。

2.2 方法的线性范围、相关系数和检测限

对标准溶液按色谱和质谱条件进行测定,标准曲线质量浓度为1 μg/L、5 μg/L、50 μg/L、100 μg/L、250 μg/L、500 μg/L、750 μg/L、1 000 μg/L,内标浓度为500 μg/L的标准工作溶液。以PAHs标准溶液与相应内标溶液的定量离子峰面积比(Y)对标样质量浓度(x)做标准曲线,得线性回归方程和相关系数,线性相关系数良好,均大于0.997。按照方法1.3建立的方法操作,做加标回收率分析,并计

算其相对标准偏差(RSD),检验其回收率及精密度,以3倍S/N、10倍S/N计算该方法标准物质的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。详见表1。

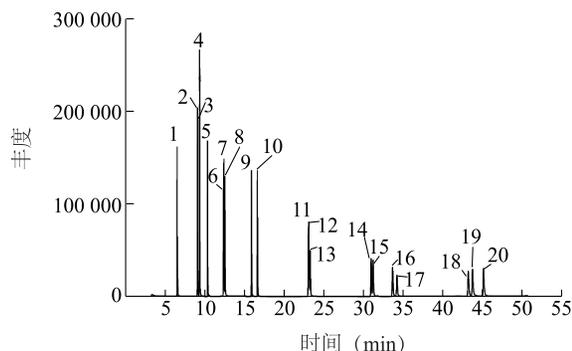


图1 16种PAHs的SIM总离子流

Fig.1 Total ion current of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in selected ion monitoring (SIM) mode

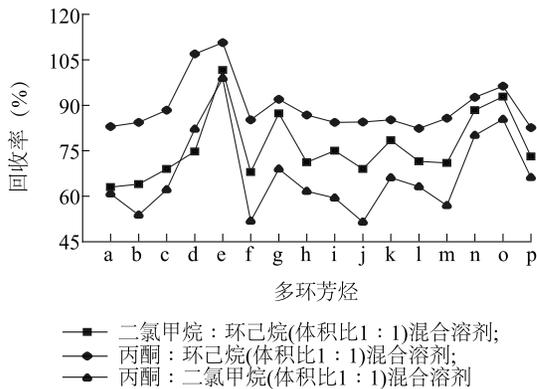
表1 16种PAHs和4种内标物缩写、定量及定性离子、保留时间、线性方程、相关系数、检出限与定量限

Table 1 Abbreviations, quantitative and qualitative ions, retention time, linear equations, correlation coefficients, detection limit and the quantitative limit of 16 PAHs and 4 internal markers

出峰顺序	化合物	缩写	定量离子	定性离子	出峰时间 (min)	线性方程	相关系数	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
1	萘	NA	128	128, 127, 129	6.347	$Y=2.42x+3.25 \times 10^{-2}$	1.000	0.018	0.053
2	蒽烯	ACL	152	152, 151, 153	8.892	$Y=2.47x+2.71 \times 10^{-2}$	0.999	0.017	0.051
3	蒽-D10	AC-D10	164	164, 162, 160	9.121				
4	蒽	AC	153	154, 153, 152	9.182	$Y=1.65x+1.98 \times 10^{-2}$	1.000	0.041	0.124
5	芴	FL	166	166, 165, 167	10.164	$Y=1.72x+2.17 \times 10^{-2}$	1.000	0.033	0.099
6	菲	PHE	178	178, 179, 176	12.169	$Y=1.13x+1.49 \times 10^{-2}$	0.998	0.060	0.171
7	菲-D10	PHE-D10	188	94, 80, 188	12.222				
8	蒽	AN	178	178, 179, 176	12.347	$Y=1.18x+1.38 \times 10^{-2}$	1.000	0.082	0.249
9	荧蒽	FA	202	202, 203, 101	15.688	$Y=1.92x+1.88 \times 10^{-2}$	0.999	0.029	0.087
10	芘	PY	202	202, 200, 101	16.443	$Y=2.00x+1.32 \times 10^{-2}$	0.999	0.031	0.093
11	苯并(a)蒽	BaA	228	228, 226, 229	22.849	$Y=1.24x+1.91 \times 10^{-2}$	0.998	0.131	0.297
12	蒽-D12	CHR-D12	240	120, 236, 240	22.901				
13	蒽	CHR	228	228, 226, 229	23.078	$Y=1.20x+2.02 \times 10^{-2}$	0.999	0.125	0.375
14	苯并(b)荧蒽	BbFA	252	252, 253, 126	30.741	$Y=1.82x+2.03 \times 10^{-2}$	0.997	0.061	0.183
15	苯并(k)荧蒽	BkFA	252	252, 253, 126	30.983	$Y=1.93x+1.17 \times 10^{-2}$	0.999	0.046	0.112
16	苯并(a)芘	BaP	252	252, 253, 125	33.442	$Y=1.42x+1.17 \times 10^{-2}$	0.998	0.062	0.186
17	芘-D12	PER-D12	264	264, 265, 260	33.981				
18	茚酚(1,2,3-cd)芘	IP	276	276, 138, 277	42.946	$Y=1.04x+1.37 \times 10^{-2}$	0.998	0.125	0.373
19	二苯并(a,h)蒽	DBahA	278	278, 139, 279	43.499	$Y=0.96x+1.21 \times 10^{-2}$	0.998	0.051	0.152
20	苯并(g,h,i)芘	BghiP	276	276, 138, 277	44.875	$Y=1.24x+1.74 \times 10^{-2}$	1.000	0.171	0.489

2.3 提取溶剂的选择

以底泥、养殖用水、草鱼、罗氏沼虾、中华绒螯蟹为试验样本,PAHs添加浓度为100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,通过溶剂标准曲线内标法定量,分别用丙酮:环己烷(体积比1:1)混合溶剂、丙酮:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂、二氯甲烷:环己烷(体积比1:1)混合溶剂为萃取剂,按照方法1.4的方法,比较不同提取剂的提取效率。从试验的结果来看,底泥中丙酮:环己烷(体积比1:1)混合溶剂提取效率最高(图2),回收为83%~101%,尤其是在低环多环芳烃萘的回收率上有明显提高。水产品和养殖用水中二氯甲烷:环己烷(体积比1:1)混合溶剂的提取效率较高(图3、图4),回收率为79%~116%,其中对葱(AN)的回收率有较大提高。因此本研究底泥中选取丙酮:环己烷(体积比1:1)混合溶剂作为提取溶剂,水产品和养殖用水选取二氯甲烷:环己烷(体积比1:1)混合溶剂作为提取溶剂。



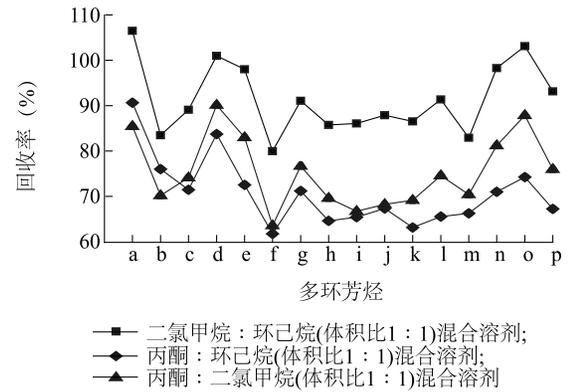
化合物名称 a:萘;b:苊烯;c:苊;d:芴;e:菲;f:葱;g:荧葱;h:蒽;i:苯并(a)葱;j:屈;k:苯并(b)荧葱;l:苯并(k)荧葱;m:苯并(a)蒽;n:蒽酚(1,2,3-cd)蒽;o:二苯并(a,h)葱;p:苯并(g,h,i)蒽。

图2 底泥中PAHs不同溶剂提取率

Fig.2 Extraction rate of PAHs in the sediment with different solvents

2.4 GPC 条件优化

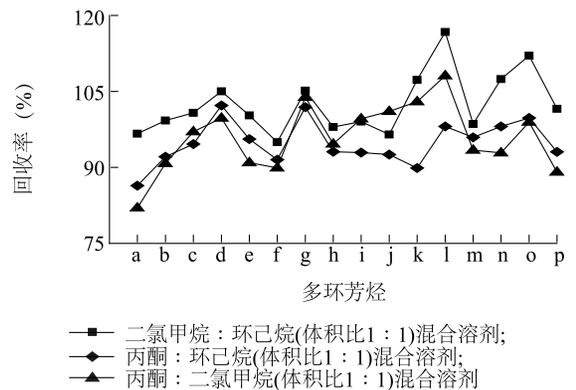
2.4.1 GPC 运行条件优化 通过研究发现,浓缩腔不同真空度和收集时间对PAHs的回收率有较大影响。试验选取浓缩腔温度为40 $^{\circ}\text{C}$ [18],分别选择3种真空度条件,3个不同收集时间来进行对比(表2)。试验结果表明,在不同真空度下,条件1和条件2回收率差不多都能达到80%以上(图5),分析数据发现条件



化合物名称 a:萘;b:苊烯;c:苊;d:芴;e:菲;f:葱;g:荧葱;h:蒽;i:苯并(a)葱;j:屈;k:苯并(b)荧葱;l:苯并(k)荧葱;m:苯并(a)蒽;n:蒽酚(1,2,3-cd)蒽;o:二苯并(a,h)葱;p:苯并(g,h,i)蒽。

图3 水产品中PAHs不同溶剂提取率

Fig.3 Extraction rate of PAHs from aquatic products with different solvents



化合物名称 a:萘;b:苊烯;c:苊;d:芴;e:菲;f:葱;g:荧葱;h:蒽;i:苯并(a)葱;j:屈;k:苯并(b)荧葱;l:苯并(k)荧葱;m:苯并(a)蒽;n:蒽酚(1,2,3-cd)蒽;o:二苯并(a,h)葱;p:苯并(g,h,i)蒽。

图4 养殖水中PAHs不同溶剂提取率

Fig.4 Extraction rate of PAHs in aquaculture water with different solvents

1 响应值更高,对于产品中PAHs含量比较低的情况,更有利于检出。对于不同收集时间内PAHs的回收率,条件4略大于条件5,相对收集时间较短,更有利于节省溶剂及时间成本(图6)。

本试验最终选取浓缩腔温度为40 $^{\circ}\text{C}$,真空度阶段一:170 mbar,阶段二:210 mbar,前运行时间1 140 s,主运行时间2 000 s,后运行时间120 s。

2.4.2 GPC 进样溶剂选择 由于样品过GPC前,

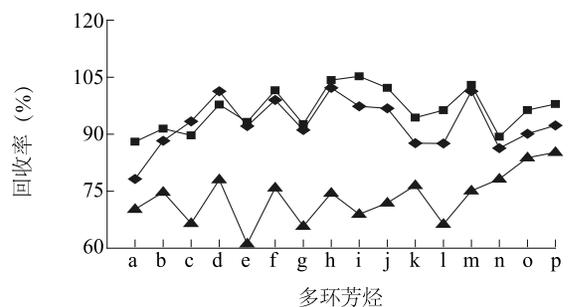
本机系统溶剂须转换为环己烷:乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂,而系统自带预浓缩及溶剂转换功能。因此,理论上不同的进样溶剂对GPC应该是没有影响的,但是试验过程中选取本试验几种不同混合溶剂,发现不同的进样溶剂对回收率也存在一定的影响。试验选用本机转换溶剂环己烷:乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂和3种不同混合进样溶剂,

丙酮:环己烷(体积比1:1)混合溶剂、丙酮:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂、二氯甲烷:环己烷(体积比1:1)混合溶剂对GPC条件进行优化后,4种混合溶剂都能达到75%以上的回收率,环己烷:乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂、丙酮:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂2种溶剂的回收效果更好。

表2 GPC运行条件

Table 2 Operating conditions of gel permeation chromatography(GPC)

	条件	阶段一真空度(mbar)	阶段二真空度(mbar)	前运行时间(s)	主运行时间(s)	后运行时间(s)
不同真空度	条件1	170	210	1 140	2 200	120
	条件2 ^[19]	180	210	1 140	2 200	120
	条件3 ^[18]	400	400	1 140	2 200	120
不同收集时间	条件4	170	210	1 140	2 000	120
	条件5 ^[18]	170	210	1 600	2 200	120
	条件6 ^[20]	170	210	720	1 140	180



■不同真空度条件1; ◆不同真空度条件2; ▲不同真空度条件3

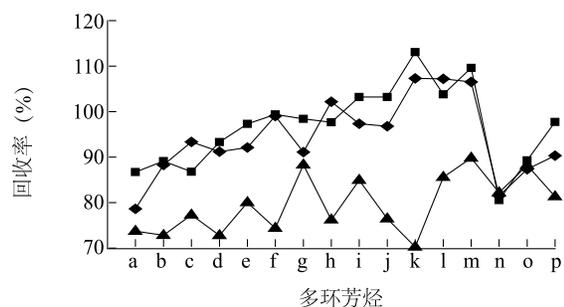
不同真空度条件1、不同真空度条件2、不同真空度条件3见表2。a:萘;b:苊烯;c:苊;d:芴;e:菲;f:蒽;g:荧蒽;h:芘;i:苯并(a)蒽;j:屈;k:苯并(b)荧蒽;l:苯并(k)荧蒽;m:苯并(a)芘;n:茚酚(1,2,3-cd)芘;o:二苯并(a,h)蒽;p:苯并(g,h,i)芘。

图5 GPC不同真空度条件对PAHs回收率的影响

Fig.5 Effects of different vacuum conditions of GPC on the recovery rate of PAHs

2.5 回收率、精密度及检测限

称取同批次的底泥、养殖用水、草鱼、罗氏沼虾、中华绒螯蟹,分别加入1.0 μg/kg、5.0 μg/kg混合标准溶液,每个处理6个平行,样品内标质量浓度为500 ng/ml。按照方法1.3建立的方法操作,做加标回收率分析,并计算其相对标准偏差(RSD),检验其回收率及精密度。结果表明,底泥的加标回收率达到52.4%~111.0%,相对标准偏差为0.64%~



■不同收集时间条件4; ◆不同收集时间条件5; ▲不同收集时间条件6

不同收集时间条件4、不同收集时间条件5、不同收集时间条件6见表2。a:萘;b:苊烯;c:苊;d:芴;e:菲;f:蒽;g:荧蒽;h:芘;i:苯并(a)蒽;j:屈;k:苯并(b)荧蒽;l:苯并(k)荧蒽;m:苯并(a)芘;n:茚酚(1,2,3-cd)芘;o:二苯并(a,h)蒽;p:苯并(g,h,i)芘。

图6 GPC不同收集时间对PAHs回收率的影响

Fig.6 Effects of different collection time of GPC on the recovery rate of PAHs

8.94%,底泥在低质量浓度1.0 μg/kg的回收率相对偏低,原因可能是在低质量浓度范围内,泥土样品基质比较复杂,从而损失率比较高。养殖用水的加标回收率达到74.1%~116.0%,相对标准偏差为0.52%~8.91%。水产品的加标回收率达到70.3%~126.0%,相对标准偏差为0.14%~8.91%。数据分析结果表明该方法满足渔业养殖环境(养殖

用水、底泥)及水产品中 PAHs 含量测定(表3)。

2.6 其他样品分析

测定了江苏南京高淳、浦口等基地的养殖池塘的底泥、水与水产品的100个样品,结果如下:鱼类产品中16种多环芳烃含量平均值为22.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$,范围为N.D(小于检测限)至63.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,虾类产品中16种多环芳烃含量平均值为11.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$,范围为N.D至38.65 $\mu\text{g}/\text{kg}$,蟹类产品中

16种多环芳烃含量平均值为34.23,范围为N.D至80.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。底泥中16种多环芳烃含量平均值为231.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$,范围为85.21至345.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$,养殖水中16种多环芳烃含量平均值为74.11 $\mu\text{g}/\text{kg}$,范围为N.D至213.89 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。测定时发现菲、葱的检出率较高,但均未发现致癌作用明显的苯并(a)芘。

表3 16种PAHs的回收率、标准偏差

Table 3 Recovery rate and standard deviation of 16 PAHs

混合标准液	底泥		养殖用水				草鱼				罗氏沼虾				中华绒螯蟹					
	1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率(%)	RSD(%)																		
萘	52.4	5.27	83.0	3.96	82.5	5.07	96.7	2.67	72.7	3.96	106.4	3.28	86.5	4.66	103.1	2.64	77.1	2.67	110.4	3.81
萘烯	60.4	4.66	84.4	0.64	87.9	0.97	99.3	1.19	70.3	3.64	103.4	3.29	83.5	3.63	95.1	1.79	74.1	1.19	109.7	3.38
葱	68.9	4.65	88.4	2.85	90.8	1.80	100.8	2.98	78.8	2.85	113.6	4.41	89.1	5.20	102.8	1.24	75.5	2.98	111.8	1.50
芴	85.8	4.64	106.9	5.43	94.7	1.44	105.0	2.39	75.6	5.43	108.5	3.98	71.0	3.45	95.9	3.93	89.5	2.39	107.2	1.97
菲	104.4	5.30	110.7	4.77	89.1	1.41	100.3	2.41	99.6	4.77	108.1	3.02	98.0	4.28	94.6	2.12	98.2	2.41	107.5	7.36
葱	60.5	5.89	85.2	3.03	86.7	3.24	95.0	1.33	71.5	3.03	100.8	3.18	80.0	4.02	89.6	2.27	71.4	1.33	105.8	3.18
荧葱	70.2	5.27	92.0	2.05	97.2	2.66	105.2	0.52	81.2	2.05	109.9	2.81	91.1	3.48	96.5	3.21	83.0	0.52	110.2	0.14
芘	66.0	6.17	86.8	2.54	88.4	3.01	98.0	1.21	77.8	2.54	109.5	3.08	85.7	3.58	99.4	2.83	81.3	1.21	106.5	1.62
苯并(a)葱	71.6	6.16	84.3	4.47	94.2	7.33	99.0	1.81	75.9	4.47	114.5	2.80	86.1	3.84	117.8	8.24	80.9	1.81	118.9	1.86
蒽	61.2	6.93	84.5	5.85	91.8	7.53	96.5	2.07	74.7	5.85	114.1	8.91	87.9	3.68	116.8	4.91	76.5	5.07	116.2	3.05
苯并(b)荧葱	71.1	7.50	85.2	1.48	94.4	1.63	107.3	1.01	75.0	4.48	126.4	8.57	86.5	4.03	100.9	6.18	72.3	4.01	111.3	7.46
苯并(k)荧葱	68.7	7.59	82.4	1.03	101.3	3.22	116.7	1.32	72.4	4.03	125.7	5.63	91.4	3.61	98.6	6.65	75.9	4.32	111.3	7.14
苯并(a)芘	66.5	8.94	85.7	0.68	74.1	8.91	98.6	0.76	76.0	3.68	104.4	3.53	82.9	5.93	88.6	3.17	73.8	3.76	99.9	2.55
蒽醌(1,2,3-cd)芘	76.2	2.92	92.7	3.30	89.4	5.70	107.4	2.03	84.4	3.30	102.7	7.32	78.3	4.77	87.9	2.07	87.3	5.03	93.2	5.72
二苯并(a,h)葱	76.7	4.79	96.3	2.43	93.9	5.79	112.1	1.14	75.0	2.43	111.9	6.08	83.1	4.05	93.2	3.82	83.5	4.14	99.5	6.91
苯并(g,h,i)芘	71.2	2.40	82.6	2.95	84.2	4.91	101.6	1.72	72.8	2.95	107.9	6.59	83.1	4.71	93.2	1.74	81.8	4.72	97.9	5.70

3 讨论

本试验建立了自动索氏抽提-凝胶渗透色谱(GPC)-气相色谱串联质谱测定渔业养殖环境中养殖用水、底泥及水产品中16种PAHs的检测方法,通过对试验条件的优化,底泥的加标回收率达到82.6%~110.7%,相对标准偏差为0.64%~3.96%,养殖用水的加标回收率达到96.5%~116.7%,相对标准偏差为0.52%~2.98%,水产品的加标回收率达到87.9%~126.4%,相对标准偏差为0.14%~

8.91%,平均检出限为0.017~0.171 $\mu\text{g}/\text{kg}$,满足了检测要求。与目前已有标准方法和其他传统方法^[19-20]比较,简化了提取步骤,节省了时间与经济成本。结合GPC净化的技术优势,提高了自动化的程度,对回收率的提高和降低基质干扰均显示出优势,提高了渔业养殖中不同样品检测结果的准确度与精确度。

3.1 样品提取

由于PAHs易附着于沉积物和固体颗粒上,而丙酮具有较好的黏滞性,加入丙酮提取可使溶剂更

好地渗入土壤组织中^[21],对土壤的杂质有较好的沉淀作用,以净化提取液,因此土壤中提取以丙酮:环己烷(体积比1:1)混合溶剂提取效果较好。在水产品和养殖水中提取以二氯甲烷:环己烷(体积比1:1)混合溶剂相较于其他2种方法,回收率更高,这是由于PAHs具有脂溶性,不易冗余水以及水产品具有较多的油脂及蛋白质,KOH-甲醇首先将产品脂肪皂化,使得样品均匀分散,环己烷、二氯甲烷为亲脂性,相较于丙酮的亲水性,环己烷:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂能够更直接从样品中将PAHs萃取出来,所以提取效率较高。

3.2 GPC 净化

目前国标法上传统的索氏抽提法抽提的溶剂,需经过溶剂萃取,硅胶柱净化,此法提取效果较为充分,但是步骤繁琐,溶剂消耗量大。本研究利用GPC净化程序,经旋转蒸发后留有部分原有提取溶剂,再用环己烷:乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂定容,无需蒸干后进行溶剂转换,减少了人工操作程序,提取效率能达到75%以上。而且试验结果表明丙酮:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂对苯并芘的回收率高于环己烷:乙酸乙酯(体积比1:1)混合溶剂,若有些仪器GPC净化柱对溶剂无特定要求,可以使用丙酮和二氯甲烷混合溶剂。

3.3 方法比较

现行使用的国家水产行业标准SC/T3042—2008^[22]可以在样品皂化后进行有机溶剂萃取测定水产品中16种PAHs,但该方法不仅取样量大(50g),净化步骤复杂,成本高,萃取次数多,多次净化导致回收率低,且有机溶剂消耗多。尤其对于中华绒螯蟹等脂肪含量较高的水产品,在低温检测环境下,皂化后的溶液很容易凝固,不易于下一步甲醇去酯化。另外,利用浓硫酸再净化,很容易导致低环萘的不同程度的损失。而采用本研究方法萘的回收率明显高于国家水产品行业标准测定方法。

土壤沉积物中多环芳烃的测定目前标准方法为HJ 805—2016^[23],该法选用丙酮和正己烷混合溶剂,从实验室工作人员安全性考虑,环己烷相较于正己烷毒性较小,且试验结果表明环己烷:丙酮(体积比1:1)混合溶剂对16种多环芳烃的回收率满足试验条件要求,此外本研究方法提取液无需过硅胶层析柱,采用GPC净化,安全又便捷。

养殖水中多环芳烃的测定标准方法为HJ478—

2009^[24],相比较单独使用环己烷或二氯甲烷,利用环己烷:二氯甲烷(体积比1:1)混合溶剂萃取,在养殖水水质较为复杂的情况下,萃取过程中出现乳化和现象,经过GPC净化,能够很好地达到净化效果。

参考文献:

- [1] 何宛雯.水产品中多环芳烃含量测定方法[J].科学之友,2013(10):32-33.
- [2] LEVENGOOD J M, SCHAEFFER D J. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and crayfish from the Calumet region of southwestern Lake Michigan [J]. *Ecotoxicology*, 2011, 20(6): 1411-1421.
- [3] SERPE F P, ESPOSITO M, GALLO P, et al. Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(3): 920-925.
- [4] 薛鸣,张虹.食品中多环芳烃残留分析前处理方法的研究[J].食品与发酵工业,2008(7):141-145.
- [5] 王丽娟.水产品中多环芳烃的检测方法及污染特征研究进展[J].渔业研究,2016,38(4):343-350.
- [6] LIAO L M, HOFMANN J N, KAMANGAR F, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk of gastric cancer in the Shanghai women's health study [J]. *BMC Cancer*, 2013(13): 282.
- [7] 王军帅,钱卓真,吴萍萍,等.水产品中多环芳烃的污染和健康风险评价模型研究进展[J].福建水产,2015,37(1):79-88.
- [8] 张春江.欧盟委员会修订多环芳烃限量法规对我国的启示[J].中国畜牧业,2011(23):66-67.
- [9] 吴雪美,张虹,戴志远,等.高效液相色谱法分析食品中多环芳烃类物质(PAHs) [J].中国粮油学报,2008,23(3):189-193.
- [10] 刘冰,霍鲁格.气相色谱-三重四级杆串联质谱法检测鱼肉中多环芳烃的研究[J].现代食品科技,2013,29(6):1395-1399.
- [11] 郭萌萌,吴海燕,杨帆,等.改进的QuEChERS-高效液相色谱法测定水产品中16种多环芳烃[J].环境化学,2013,32(6):1025-1031.
- [12] 马瑞欣,苏欢欢,梁艳红,等.水产品中多环芳烃的检测技术研究进展[J].河北渔业,2017(5):34-37,62.
- [13] WOLSKA L, ZYGMUNT B, NAMIESNIK J. Organic pollutants in the Odra river ecosystem [J]. *Chemosphere*, 2003, 53: 561-569.
- [14] 孙闰霞,柯常亮,林钦,等.水产品中多环芳烃分析方法研究进展[J].食品与发酵工业,2012,38(10):128-133.
- [15] 游钊,刘滔,曹霞,等.大气PM2.5中16种多环芳烃的聚焦微波辅助萃取-气相色谱质谱联用快速测定法[J].环境与健康杂志,2017,34(11):999-1003.
- [16] 彭驰,廖晓兰,王美娥.自动索氏-固相萃取-GC/MS测定土

- 壤中多环芳烃方法的建立[J].湖南农业科学,2009(6):57-60.
- [17] 李 斌,刘昕宇,解启来,等.自动索氏抽提-凝胶渗透色谱(GPC)-气相色谱/质谱法测定沉积物中多环芳烃和有机氯农药[J].环境化学,2014,33(2):236-242.
- [18] 甘志永,于 佩,徐 蕾.加速溶剂萃取-GPC 净化-GC-MS/MS 测定土壤中的 16 种多环芳烃[J].环境科技,2018,31(2):60-64,69.
- [19] 汤 桦,陈大舟,吴 雪,等.同位素稀释高分辨质谱法测定鱼组织中 6 种多环芳烃[J].质谱学报,2010,31(4):208-213
- [20] 张萌萌,丁 云,应晓虹,等.凝胶净化-气质联用法测定婴幼儿米粉中的多环芳烃[J].福建分析测试,2014,23(5):10-14.
- [21] 郑睿行,祝华明,黄立超,等.凝胶渗透色谱净化-高效液相色谱法检测油茶籽油中 15 种多环芳烃[J].中国油脂,2014,39(7):86-90.
- [22] 水产品中 16 种多环芳烃的测定 气相色谱-质谱法:SC/T 3042—2008[S].北京:中国农业出版社,2011.
- [23] 土壤和沉淀物多环芳烃的测定 气相色谱-质谱法:HJ 808—2016[S].北京:中国环境科学出版社,2016.
- [24] 中华人民共和国国家环境保护标准 HJ478—2009 水质多环芳烃的测定 液液萃取和固相萃取高效液相色谱法:HJ478—2009[S].北京:中国环境科学出版社,2009.

(责任编辑:陈海霞)