

文章编号: 1674 - 5566(2014)06 - 0948 - 06

## 亚临界水萃取及气相色谱-质谱法测定烟熏鱼中苯并(a)芘残留

史 思<sup>1</sup>, 伊雄海<sup>2</sup>, 赵善贞<sup>2</sup>, 邓晓军<sup>2</sup>, 陈舜胜<sup>1</sup>, 樊 祥<sup>2</sup>, 朱 坚<sup>2</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海出入境检验检疫局 动植物与食品检验检疫技术中心, 上海 200135)

**摘 要:** 建立了亚临界水萃取 (SCWE) 及气相色谱-质谱 (GC-MS) 检测熏鱼中苯并(a)芘残留的方法。实验表明, 样品经 100 °C 的亚临界水提取 5 min 后, 将目标物转移至环己烷-乙酸乙酯 (1:1, V/V) 中, 经凝胶渗透色谱 (GPC) 净化, Rtx-5MS 毛细管气相色谱柱分离, 在选择离子监测 (SIM) 模式下检测。目标物在 0 ~ 100 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.9999, 其定量限为 2.5 ng/g, 检出限为 1 ng/g。烟熏鱼基质中添加 2.5、5 和 10 ng/g 三个水平的标准品时, 苯并(a)芘的回收率为 74.89% ~ 114.01%, 相对标准偏差 (RSD) 为 7.95% ~ 10.56% (n = 8)。该方法的灵敏度良好、准确度和精密度均符合分析要求, 适用于烟熏鱼中苯并(a)芘残留的检测。

**研究亮点:** 目前鲜有亚临界水萃取技术应用于食品污染物检测分析中的报道。采用亚临界水技术萃取烟熏鱼中的苯并(a)芘残留, 实验获得最佳萃取条件, 并结合气相色谱-质谱法进行测定。为亚临界水萃取技术在食品污染物的进一步研究以及环境保护型检测分析方法的开发提供基础资料。

**关键词:** 亚临界水萃取; 凝胶渗透色谱; 气相色谱-质谱; 苯并(a)芘; 烟熏鱼

**中图分类号:** TS 207.7

**文献标志码:** A

苯并(a)芘 [B(a)P] 是一类持久性有害污染物, 占所有多环芳烃 (PAHs) 的 1% ~ 20%, 作为 PAHs 的典型代表种类之一, 被国际癌症研究中心列为 2A 类致癌物<sup>[1]</sup>。其主要来源包括: 加工过程污染、贮存运输过程的污染、饲料污染和环境污染等<sup>[2]</sup>。而各类食品中以烟熏食品中的 B(a)P 污染最为严重。随着国内消费者对烟熏鱼制品的青睐, 我国近年来对其制品的进口量日益增加。因此, 分析检测烟熏鱼制品中的苯并(a)芘残留, 对了解我国烟熏动物制品中苯并(a)芘含量的污染程度具有一定的意义。

我国颁布了 GB 2762—2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》, 规定动物制品中苯并(a)芘的最大残留限量 (MRL) 为 5 ng/g<sup>[3]</sup>。由于动物制品成分复杂, 存在着大量的干扰检测物质, 其中苯并(a)芘含量又极低, 分析检测难度较大。目前国内外研究提取苯并(a)芘的方法很

多, 主要有索氏提取和微波辅助提取。超临界流体萃取虽然也是一种低毒性及环境保护型的技术, 但其对目标物的极性要求高, 限制了它的广泛运用。然而亚临界水萃取技术通过变换萃取温度和萃取时间, 以水为溶剂可以有效地提取烟熏鱼制品中的苯并(a)芘。因为在亚临界状态下, 水的极性发生了很大的变化, 不仅可以降低水的介电常数, 而且可以增强扩散, 改善动力学特性, 降低表面张力及粘度<sup>[4]</sup>。从而亚临界水能在一个较宽的范围内溶解极性极低的苯并(a)芘。目前国内外对亚临界水在多环芳烃检测中的研究主要集中在萃取土壤、沉积物、空气颗粒<sup>[5]</sup>等环境污染方面, 鲜有对动物制品中苯并(a)芘残留进行萃取的报道。

本实验采用亚临界水萃取技术, 凝胶渗透色谱净化, 气相色谱-质谱法分析烟熏鱼中苯并(a)芘残留的检测方法。本方法简便、环保、准确, 为

收稿日期: 2014-04-18 修回日期: 2014-06-16

基金项目: 质检公益行业科研专项 (201010073 - 04); 质检公益行业科研专项 (201110019 - 04)

作者简介: 史 思 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: shi. si@ hotmail. com

通信作者: 伊雄海, E-mail: yixh@ shciq. gov. cn

亚临界水技术进一步在食品污染物的检测分析提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

主要仪器:气相色谱-质谱仪(日本岛津公司);亚临界水萃取仪(湖北众康科技有限公司);GPC-全自动定量浓缩仪(德国 LCTech 公司);XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);Allegria X-22R 高速冷冻离心机(Beckman 公司);Milli-Q 超纯水一体机(Millipore 公司);N-EVAP 氮吹仪(Organo-mation 公司)。

主要试剂:环己烷、乙酸乙酯、乙腈(色谱纯,Merck 公司);苯并(a)芘标准品(纯度均大于 99%,Dr. Ehrenstorfer 公司)。

苯并(a)芘标准储备液和工作液的配制:准确称取适量的苯并(a)芘标准品,用乙腈配制质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液;再用乙腈稀释成质量浓度为 100  $\text{ng}/\text{mL}$  的标准工作液。以上溶液均置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

样品制备:取适量烟熏鱼制品,绞碎混匀。

### 1.2 样品前处理

#### 1.2.1 提取

称取 2.0 g 经粉碎后的熏鱼,置于亚临界水萃取仪专用玻璃试管中,涡旋混合均匀,将玻璃试管置于亚临界水萃取仪中,以水为萃取溶剂,萃取温度为 100  $^{\circ}\text{C}$ ,萃取 5 min。收集萃取液,在萃取液中加入 5 mL 环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V),涡旋振荡混合,4 000  $\text{r}/\text{min}$  离心 5 min,收集上清液,残渣再用 5 mL 环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)重复提取 1 次,合并上清液,用环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V)定容至 10 mL,待净化。

#### 1.2.2 GPC 净化

GPC 定量环体积为 5 mL,流动相为环己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V),净化后浓缩至 2 mL,氮气吹干,用乙腈定容至 400  $\mu\text{L}$ ,涡旋混匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤后供 GC-MS 测定。

### 1.3 色谱质谱条件

色谱条件:Rtx-5MS 毛细管气相色谱柱(30.0  $\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$ , 0.25  $\mu\text{m}$ );进样模式:分流;分流比:50:1;载气:氮气(纯度为 99.999%);流速:1.0  $\text{mL}/\text{min}$ ;进样量:1.0  $\mu\text{L}$ ;进样口温度:280  $^{\circ}\text{C}$ ;梯度升温程序:初始 70  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 2 min,以 20

$^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 200  $^{\circ}\text{C}$ (保持 1.0 min),10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 310  $^{\circ}\text{C}$ (保持 8.0 min)。

质谱条件:电离方式为 EI(70 eV);扫描方式为选择离子监测(SIM)模式;离子源温度为 230  $^{\circ}\text{C}$ ;接口温度为 280  $^{\circ}\text{C}$ 。B(a)P 的监测离子为 252\*、250、253 和 126,其中 \* 为定量离子。

## 2 结果

### 2.1 萃取条件的选择

#### 2.1.1 萃取溶剂的选择

实验选用纯水、30% 乙醇溶液和 50% 乙醇溶液作为萃取溶剂,比较了三者的提取效率,结果表明纯水的萃取效率最高,且提取效率稳定,样品中的苯并(a)芘提取率可达 74% 以上。因此,本实验选取纯水作为萃取溶剂。

#### 2.1.2 萃取温度的优化

图 1 显示了苯并(a)芘在不同萃取温度(100  $^{\circ}\text{C}$ 、150  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $^{\circ}\text{C}$ )下萃取 5 min 时的提取效率。苯并(a)芘的提取效率随着温度的升高而下降,100  $^{\circ}\text{C}$  时的提取率为 91.2%,而 150  $^{\circ}\text{C}$  和 200  $^{\circ}\text{C}$  时得到的提取率分别为 73.1% 和 51.2%,由此可见,100  $^{\circ}\text{C}$  时的提取效率明显优于 150  $^{\circ}\text{C}$  和 200  $^{\circ}\text{C}$ 。因此,本实验选取 100  $^{\circ}\text{C}$  作为最佳萃取温度。

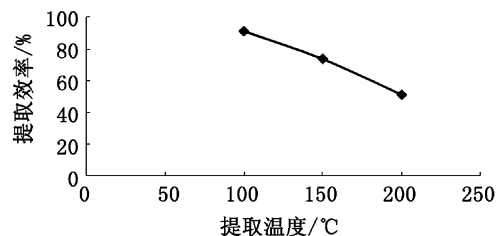


图 1 苯并(a)芘在不同萃取温度时的提取效率  
Fig. 1 Extraction efficiency of B(a)P at different extraction temperature

#### 2.1.3 萃取时间的优化

萃取时间对萃取效率的影响见图 2。100  $^{\circ}\text{C}$  的温度条件下,本实验选取了 5、15 和 30 min 三个时间点。结果表明,随着萃取时间的增加,苯并(a)芘的萃取回收率无显著提高,而萃取时间为 5 min 时的萃取效率最高。因此,本实验确定的萃取时间为 5 min。

### 2.2 色谱/质谱条件的选择

取浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{g}$  的苯并(a)芘标准溶液,全

扫描(SCAN)模式监测,总离子流图见图3。在其相应模式下进行离子扫描,通过调节仪器参数使离子的丰度最大,如图4所示,选取得到的特征离子为  $m/z$  252、250、253 和 126。

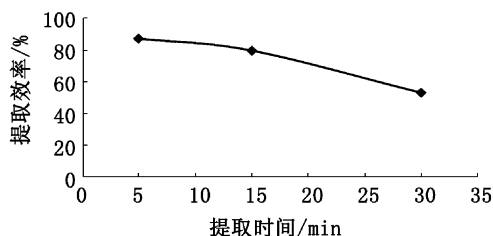


图2 苯并(a)芘在不同萃取时间的提取效率  
Fig. 2 Extraction efficiency of B(a)P at different extraction time

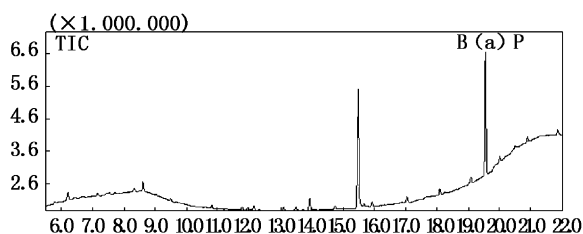


图3 1 µg/g 苯并(a)芘标准溶液的总离子流(SCAN)色谱图

Fig. 3 Total ion flow (SCAN) chromatogram of B(a)P standard solution at 1 µg/g

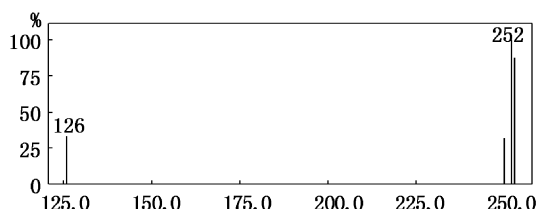


图4 苯并(a)芘标准溶液的质谱图(SIM)  
Fig. 4 Mass spectrum (SIM) of B(a)P standard solution

### 2.3 GPC 系统条件的选择

GPC 洗脱流速为 5.0 mL/min,以 120 s 为间隔收集洗脱液。通过 GC-MS 检测,结果如图 5 显示,苯并(a)芘在 1 800 s 以后出峰,其流出时间主要集中在 1 860 ~ 3 180 s,故选择收集时间为 1 800 ~ 3 240 s。研究发现,GPC 可将苯并(a)芘从复杂基质中净化出来,能有效去除熏鱼制品中大量的脂肪及其他脂溶类物质<sup>[6]</sup>。

### 2.4 线性范围和灵敏度

对苯并(a)芘标准系列浓度进行 GC-MS 测

定,以峰面积对质量浓度绘制标准曲线,结果表明,在 0 ~ 100 ng/mL 范围内,其线性回归方程为  $y = 2232.954x$ ,线性相关系数  $R^2 = 0.9999$ ,图 6 为苯并(a)芘标准品选择离子监测色谱图。在空白烟熏鱼基质中添加目标化合物,以信噪比 ( $S/N > 10$ ) 确定苯并(a)芘的定量限(LOQ)为 2.5 ng/g,以  $S/N > 3$  确定苯并(a)芘的检出限(LOD)为 1 ng/g。

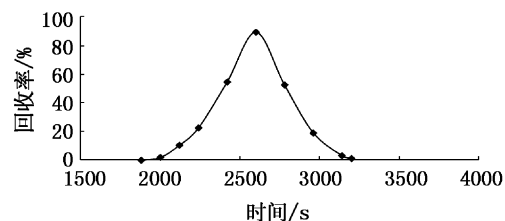


图5 苯并(a)芘的 GPC 流出曲线

Fig. 5 GPC elution curve of B(a)P

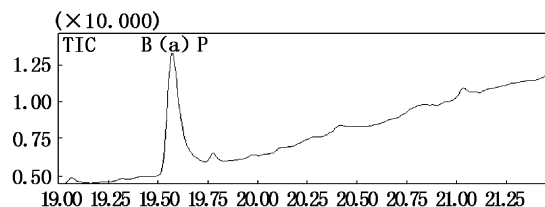


图6 10 ng/g 苯并(a)芘标准溶液的选择离子监测(SIM)色谱图

Fig. 6 SIM chromatogram of B(a)P standard solution at 10 ng/g

### 2.5 回收率与精密度

称取 2.0 g 烟熏鱼样品,分别添加 2.5、5.0 和 10.0 ng/g 3 个水平的标准品,按上述方法进行处理,用 GC-MS 测定,外标法定量,每个添加水平重复 8 次,所得回收率与精密度见表 1,图 7 ~ 8 为空白和添加水平为 10 ng/g 样品的选择离子监测色谱图。结果表明苯并(a)芘的回收率范围为 74.89% ~ 114.01%,相对标准偏差(RSD)范围为 7.95% ~ 10.56%,符合烟熏鱼中苯并(a)芘残留的检测要求。

表1 烟熏鱼中苯并(a)芘的加标回收率和精密度( $n=8$ )

Tab. 1 Recoveries and precisions of B(a)P in smoked fish ( $n=8$ )

添加浓度 / (ng/g)	苯并(a)芘		
	最大回收率 / %	最小回收率 / %	相对标准偏差 / %
2.5	74.89	101.72	10.56
5	85.06	114.01	10.36
10	83.34	103.81	7.95

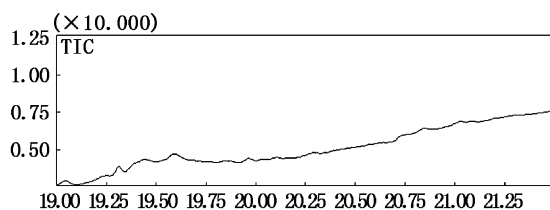


图7 空白熏鱼基质的选择离子监测(SIM)色谱图

Fig. 7 SIM chromatogram of a blank smoked fish sample

## 2.6 实际样品检测

分别采用亚临界水萃取及气相色谱-质谱法、国标法(GB/T 5009.27—2003<sup>[3]</sup>)及行标法(SC/T 3042—2008<sup>[7]</sup>)对我国进出口烟熏三文鱼、烟

熏鲑鱼、烟熏鱼罐头等总计 10 件样品中的苯并(a)芘残留进行检测,测定结果见表 2。本实验方法同国标法及行标法相比结果相当。因此,本实验采用的方法具有一定的可靠性,可应用于烟熏鱼中苯并(a)芘残留的测定。

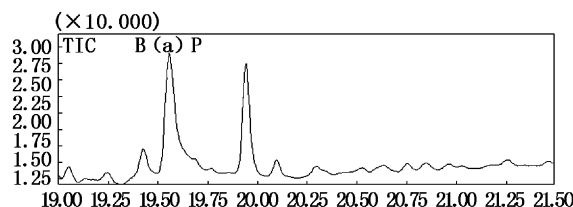


图8 添加浓度为 10 ng/g 的空白熏鱼基质中苯并(a)芘的选择离子监测(SIM)色谱图

Fig. 8 SIM chromatogram of a smoked fish sample spiked with the B(a)P at 10 ng/g

表 2 不同方法下烟熏鱼制品中苯并(a)芘残留的测定结果

Tab. 2 Detection results of B(a)P by different methods in smoked fish products

样品种类	测得值/(ng/g)		
	亚临界水萃取及气相色谱-质谱法	GB/T 5009.27—2003 荧光分光光度法	SC/T 3042—2008 气相色谱-质谱法
样品-1	0.97	1.3	0.28
样品-2	-	-	-
样品-3	0.19	0.88	0.43
样品-4	-	-	0.11
样品-5	-	-	-
样品-6	-	-	-
样品-7	-	-	-
样品-8	0.51	0.36	0.84
样品-9	-	-	-
样品-10	-	-	-

注: - 表示未检出。

## 3 讨论

### 3.1 亚临界水萃取条件对萃取效率的影响

亚临界水是指常温常压下的水被加热到 100 ℃以上,临界温度以下时,仍旧保持液体状态。由于压力和温度的变化,水的介电常数、表面张力和粘度等发生变化,因此亚临界水的物理、化学特性区别于常温常压下的水,从而实现选择性提取烟熏鱼中极性极低的苯并(a)芘。

亚临界水萃取技术中影响萃取效率最主要的因素是萃取温度,一般来说萃取效率会随着萃取温度的升高而提高,因此理论上在较高温度下进行萃取可以尽可能多地提取目标物。但是正如本实验结果所表明的,在萃取苯并(a)芘时随着温度的升高,提取率反而下降。究其原因可能

是因为萃取温度太高会导致一部分苯并(a)芘的降解或者是一部分苯并(a)芘在高温下挥发。正如 YANG 等<sup>[4]</sup>用亚临界水萃取技术从牛至叶中萃取 5 种萜烯类物质时,这 5 种萜烯类物质的稳定性随着温度的升高反而会降低。因此,最佳萃取温度应该根据不同的原料及提取的目标物进行选择。由于亚临界水是指被加热到 100 ℃以上的状态,本实验比较了 100 ℃、150 ℃和 200 ℃ 3 个萃取温度,经过验证 100 ℃为萃取烟熏鱼中苯并(a)芘的最佳温度。

萃取时间也是相关的重要因素之一,亚临界水萃取目标物一般所需时间较短,几乎 1 h 内就可以完成前处理。本实验通过比较 5、15 和 30 min 3 个萃取时间,结果发现萃取效率并不随着萃取时间的延长而提高,苯并(a)芘在 5 min 时就

可以得到较好的提取效率。可能是由于萃取完毕后,再延长萃取时间,原本已经提取出的苯并(a)芘会被重新分配回样品中。HAWTHORNE等<sup>[8]</sup>用亚临界水技术萃取土壤、沉积物中的PCBs时,萃取1 h所测得的浓度与索氏提取18 h所得结果相当。因此,本实验得出采用亚临界水技术萃取烟熏鱼中的苯并(a)芘,在5 min内即可得到较高的萃取效率,相较于传统萃取方法十几个小时的前处理时间,本方法具有明显的时间优势。

亚临界水萃取技术对压力的要求较低,它主要受温度的影响,只要适当的压力(小于4 MPa)使亚临界水保持在液体状态即可<sup>[8]</sup>。因此本实验对于萃取压力不做进一步研究。

### 3.2 色谱/质谱条件的选择对分离苯并(a)芘的影响

色谱分离时,不同的升温程序影响目标物的分离情况。通过对柱温升温程序的优化,消除溶剂中的杂质干扰,使得苯并(a)芘达到最大化的分离。并在相应模式下进行离子扫描,调节仪器参数,得到丰度大、干扰小的定性、定量离子。通过色谱/质谱条件的选择,本实验中苯并(a)芘的保留时间为19.57 min,短时间内就可得到目标

物色谱峰,由此可见,本方法对苯并(a)芘有较好的分离效果。

### 3.3 不同萃取方法的比较

比较亚临界水萃取及气相色谱-质谱法及GB/T 5009.27—2003<sup>[3]</sup>、GB/T 4893—2010<sup>[9]</sup>、SC/T 3042—2008<sup>[7]</sup>的萃取条件。结果发现,苯并(a)芘残留的检测主要应用于动植物油、水产品等食品,鲜少对动物熟制品中苯并(a)芘残留的报道。而亚临界水萃取技术作为一种新的绿色萃取技术,研究表明适用于苯并(a)芘等复杂组分的萃取。由表3可见,相较于常见的萃取方法,亚临界水技术萃取苯并(a)芘具有以下优点:(1)样品的称样量仅为2 g,相较于传统方法,节省了样品量;(2)提取时间只需要5 min,与其他方法相比,大大缩短了前处理时间,提高了实验效率;(3)相对于传统方法有机试剂消耗量大的缺点,纯水作为萃取剂被视为一种环境保护型萃取试剂;(4)萃取装置和操作都比较简单,萃取条件也不苛刻。因此,亚临界水萃取技术对环境没有污染或污染很少,符合“绿色化学”的要求,在烟熏鱼制品中苯并(a)芘残留的检测方面得到了良好的应用。

表3 不同方法萃取条件的比较

Tab.3 Comparison of the extraction conditions in different methods

方法	亚临界水萃取及气相色谱-质谱法	GB/T 5009.27—2003	GB/T 4893—2010	SC/T 3042—2008
检测方法	气相色谱-质谱法	荧光分光光度法	高效液相色谱法	气相色谱-质谱法
基质	烟熏鱼制品	肉、油和水产品等	动植物油	水产品
目标物	苯并(a)芘	苯并(a)芘	苯并(a)芘	多环芳烃
称样量/g	2	50~60	2.5	50
萃取时间/min	5	600~720	120~160	30~600
有机溶剂消耗/mL	-	200	100	500
萃取装置和操作	简便	复杂	复杂	复杂

注:-表示未使用有机溶剂。

### 参考文献:

- [1] 王欣,周智慧,赵晓联. 苯并(a)芘危害性及其检测[J]. 粮食与油脂,2011(3):48-49.
- [2] 闫世平,李光宪,郑家概,等. HPLC/FLD法测定环境样品和食品中的苯并[a]芘[J]. 分析测试学报,2008,27(6):627-630.
- [3] 郑睿行,夏爱萍,祝华明,等. 凝胶渗透色谱-液相色谱法测定熏烤肉制品中的苯并(a)芘[J]. 食品研究与开发,2013,34(12):76-78.
- [4] YANG Y, MAYA B, LAGADEC A, et al. Elution of organic

solutes from different polarity sorbents using subcritical water [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 810(1/2):149-159.

- [5] HAWTHORNE S B, TREMBLEY S, MONIOT C L, et al. Static subcritical water extraction with simultaneous solid-phase extraction for determining polycyclic aromatic hydrocarbons on environmental solids[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 886(1):237-244.
- [6] SAITO K, SJODIN A, SANDAU C D, et al. Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation

- chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis [J]. *Chemosphere*,2004,57(5):373-381.
- [7] 杨家锋,钟惠英,段青源,等. 气相色谱-质谱联用法测定水产品中 16 种多环芳烃[J]. *中国卫生检验杂志*,2009(10):2291-2295.
- [8] HAWTHORNE S B,GRABANSKI C B,HAGEMAN K J,et al. Simple method for estimating polychlorinated biphenyl concentrations on soils and sediments using subcritical water extraction coupled with solid-phase microextraction [J]. *Journal of Chromatography A*,1998,814(1):151-160.
- [9] 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.

## Determination of benzo ( a ) pyrene residue in smoked fish by subcritical water extraction and gas chromatography-mass spectrometry

SHI Si<sup>1</sup>, YI Xiong-hai<sup>2</sup>, ZHAO Shan-zhen<sup>2</sup>, DENG Xiao-jun<sup>2</sup>, CHEN Shun-sheng<sup>1</sup>, FAN Xiang<sup>2</sup>, ZHU Jian<sup>2</sup>

(1. *College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Technical Center of Inspection & Quarantine in Plants, Animals and Food, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China*)

**Abstract:** A method was developed for the B(a)P determination in smoked fish by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method with subcritical water extraction (SCWE). B(a)P were extracted by water under the extraction temperature of 100 °C for 5 min, transferred into cyclohexane-ethylacetate (1:1, V/V) and then cleaned up by the Gel Permeation Chromatography (GPC). The GC separation was performed on a Rtx-5MS capillary column. The B(a)P were determined by MS in selected ion monitoring (SIM) mode. The method showed good linearity over the range of 0 to 100 ng/mL with the correlation coefficient of 0.9999. The limit of quantification (S/N > 10) was 2.5 ng/g, the limit of detection (S/N > 10) was 1 ng/g and the precision (RSD) was between 7.95% and 10.56%. The average blank spike recoveries at three levels of 2.5, 5 and 10 ng/g ranged from 74.89% to 114.01% (n=8). The sensitivity, accuracy and precision of the method are suitable for the determination of the B(a)P in smoked fish.

**Key words:** subcritical water extraction; gel permeation chromatography (GPC); gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); B(a)P; smoked fish