

基于溶剂诱导相变萃取的在线固相萃取-高效液相色谱法测定血清中多环芳烃含量

刘丹华, 阮征, 朱海豹, 徐承敏, 王晗, 柴剑荣, 钱亚玲, 唐红芳

浙江省医学科学院卫生学研究所, 浙江 杭州 310013

摘要:

[背景] 目前血中多环芳烃 (PAHs) 的检测方法存在操作烦琐费时、有机溶剂消耗量大、测定多环芳烃种类少等不足, 有待改进。

[目的] 建立简便有效、绿色环保的在线固相萃取-高效液相色谱方法测定血中多种 PAHs 含量。

[方法] 比较甲醇-水系统和乙腈-水系统对 PAHs 的分离效果, 并进一步优化液相色谱条件; 比较 Hypersep Hypercarb 柱、Dionex InGuard HRP 柱、Hypersep Retain PEP 柱以及 C₁₈ 在线 SPE 柱对 PAHs 的亲和力以选择 SPE 柱并确定切换程序; 此外, 比较了不同诱导剂 (二氯甲烷、三氯甲烷和甲苯) 的诱导效果, 并采用 4 因素 3 水平正交试验考察了乙腈、二氯甲烷以及无机盐氯化钠的用量对诱导相变萃取效率的影响。并进行方法学验证, 将所建立的方法应用于 8 名机械工人和 6 名普通人群的血样 PAHs 测定。

[结果] 采用 C₁₈ 在线 SPE 柱, 用甲醇-水系统进行洗脱时对 PAHs 分离效果良好。正交试验结果显示乙腈 0.50 mL、二氯甲烷 0.05 mL 及不用氯化钠为最佳前处理条件。结果表明 15 种多环芳烃在 1.00~50.00 µg/L 范围内线性关系良好, 决定系数均大于 0.999; 方法检出限 (信噪比 S/N=3) 为 0.01~0.20 µg/L, 平均加标回收率为 90.8%~107.0%, 相对标准偏差 (n=6) 为 1.6%~4.4%。采用该法测定了 8 名机械工人和 6 名普通人群的血样, 低环 PAHs 的检出率高, 高环 PAHs 的检出率低; 机械工人比普通人群多检出 3 种高环 PAHs。

[结论] 所建方法能同时测定血清中 15 种多环芳烃的含量, 具有简便高效、准确可靠及环境友好等优点, 可为开展多环芳烃的暴露风险评估和毒理学研究提供一定的方法学支持。

关键词: 多环芳烃; 溶剂诱导相变萃取法; 在线固相萃取; 高效液相色谱法; 血清

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in serum by high performance liquid chromatography with online solid phase extraction based on solvent induced phase transition extraction LIU Dan-hua, RUAN Zheng, ZHU Hai-bao, XU Cheng-min, WANG Han, CHAI Jian-rong, QIAN Ya-ling, TANG Hong-fang (Institute of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Science, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

Abstract:

[Background] Existing methods for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in blood have some shortcomings, such as complex and time-consuming operation, large consumption of organic solvents, and few detected kinds of PAHs, which need to be improved.

[Objective] This methodological study aims to establish a simple, effective, and environmentally friendly online solid phase extraction (SPE)-high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of multiple PAHs in blood.

[Methods] The separation effects of methanol-water system and acetonitrile-water system on PAHs were compared, and the liquid chromatography conditions were further optimized. The affinities of Hypersep Hypercarb column, Dionex InGuard HRP column, Hypersep Retain PEP column, and C₁₈ online SPE column for PAHs were compared to select SPE column and determine valve switching procedure. In addition, the induction effects of different inducers (dichloromethane, trichloromethane, and and toluene) were compared, and the effects of different dosages of acetonitrile, dichloromethane, and inorganic sodium chloride on induced phase change extraction efficiency were investigated by four-factor and three-level orthogonal test. Methodological validation was performed by applying the established method to the

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19305

基金项目

浙江省科学技术厅公益技术应用研究 (分析测试) 项目 (2017C37063)

作者简介

刘丹华 (1983—), 女, 硕士, 助理研究员; E-mail: liudanhua_123@163.com

通信作者

唐红芳, E-mail: hf_tang@126.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-05-07

录用日期 2019-09-30

文章编号 2095-9982(2019)11-1055-06

中图分类号 R113

文献标志码 A

引用

刘丹华, 阮征, 朱海豹, 等. 基于溶剂诱导相变萃取的在线固相萃取-高效液相色谱法测定血清中多环芳烃含量 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (11): 1055-1059, 1070.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19305

Funding

This study was funded.

Correspondence to

TANG Hong-fang, E-mail: hf_tang@126.com

Competing interests None declared

Received 2019-05-07

Accepted 2019-09-30

To cite

LIU Dan-hua, RUAN Zheng, ZHU Hai-bao, et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in serum by high performance liquid chromatography with online solid phase extraction based on solvent induced phase transition extraction[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(11): 1055-1059, 1070.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19305

determination of PAHs in blood samples of eight mechanical workers and six general people.

[Results] The C_{18} online SPE column showed good separation of PAHs when being eluted with methanol-water system. The results of orthogonal test showed that 0.50 mL acetonitrile, 0.05 mL dichloromethane, and no sodium chloride were the best pretreatment conditions. The linear relationships of 15 PAHs were good in the range of 1.00~50.00 $\mu\text{g/L}$, the determination coefficients were above 0.999, and the detection limits (signal-to-noise ratio, $S/N=3$) were 0.01-0.20 $\mu\text{g/L}$. The average recovery rates were 90.8%-107.0%, and the relative standard deviations ($n=6$) were 1.6%-4.4%. The blood samples of eight mechanical workers and six general people were determined by this method, detection rates of low-ring PAHs were high, and the detection rates of high-ring PAHs were low; three more high-ring PAHs were detected in the mechanical workers than in the general subjects.

[Conclusion] The proposed method can simultaneously determine the contents of 15 PAHs in serum, and is simple, efficient, accurate, reliable, and environmentally friendly. It can provide methodological support for exposure risk assessment and toxicology research of PAHs.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons; solvent induced phase transition extraction; online solid phase extraction; high performance liquid chromatography; serum

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类广泛存在的持久性有机污染物, 由于其致癌、致畸和致突变性而受到高度关注。PAHs 可通过皮肤、呼吸道和消化道进入人体, 血中游离 PAHs 的含量作为内暴露水平指标, 直接反映人体内的 PAHs 负荷量, 可用于评价接触人群的暴露程度及其对健康的影响。

目前血中 PAHs 检测方法主要有液相色谱法^[1]、液相色谱-质谱法^[2]和气相色谱-质谱法^[3-4]。然而质谱仪器价格昂贵, 普及率较低; 目前血样的前处理多采用液液萃取法、直接沉淀蛋白法及离线的固相萃取法 (solid phase extraction, SPE), 除操作烦琐费时、有机溶剂用量较大外, 还存在蛋白沉淀不完全、基质背景干扰大等不足, 因此高效液相色谱法的应用有限, 测定的 PAHs 种类较少。

溶剂诱导相变萃取法是由 Liu 等^[5]在 2010 年首次命名并用于血浆样品分离提取的新方法。该法是基于疏水性有机溶剂诱导乙腈/水均相体系分相原理, 即先将血样和乙腈混合形成均相体系, 然后加入少量二氯甲烷等疏水性且与乙腈互溶的有机溶剂作为诱导剂使整个体系分相。得到的上层有机相为乙腈 (含少量诱导剂), 与常用的反相液相流动相系统兼容, 可直接上机分析。且该法不需要溶剂回收, 仅通过减少乙腈和诱导剂的用量即可实现自动浓缩。该法较传统方法操作简单快速, 仅需要移取溶剂、振荡、离心步骤即可完成; 有机溶剂用量少 (1~2 mL), 方法的浓缩比大, 回收率高; 且无须特殊装置, 易于推广使用。

近年发展起来的在线 SPE 方法是一种全自动样品前处理方式, 较离线 SPE 方法具有富集纯化一步完成、SPE 柱可多次使用、重现性好、简便环保等优点^[6]。在线 SPE 方法与高效液相色谱法联用, 在分析过程中可实现在线 SPE 柱的再生与平衡, 同时设定切阀程序避免大量的非目标物质进入分析柱, 提高分析柱的使用

寿命^[7]。

本研究应用溶剂诱导相变萃取法一步实现血中 PAHs 的分离和浓缩, 进而采用双三元液相色谱系统, 通过六通阀进行在线 SPE 柱与色谱分析柱的在线柱切换, 实现血中 PAHs 的再次萃取分离, 进一步降低样品萃取液中的蛋白和基质含量; 用荧光检测器测定美国国家环境保护署规定优先监测的 16 种 PAHs 污染物中的 15 种 PAHs, 因蒽烯无荧光效应, 故不纳入分析。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

双三元液相色谱系统 (Thermo, 美国), 配置 6 通道真空脱气机 SRD3600, 双梯度分析型色谱泵 DGP3600 (含有一个左泵和一个右泵), 自动温控进样器 WPS3000TSL, 荧光检测器 FLD3100, 柱温箱 TCC-3000 (配有 2p-6p 六通阀), 变色龙色谱管理软件 Chromeleon 7.2。涡旋振荡器 (IKA, 德国), H-2050R 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪, 中国), 超纯水仪 (Sartorius, 德国)。

16 种 PAHs 混合标准品: 蒽、蒽烯、葱、苯并[a]葱、苯并[a]芘、苯并[b]荧葱、苯并[g, h, i]花、苯并[k]荧葱、屈、双苯并[a, h]荧葱、荧葱、芴、茚并[1, 2, 3-cd]芘、蔡、菲、芘 (0.5 mg/mL, AccuStandard, 美国); 乙腈、甲醇、二氯甲烷 (色谱纯, TEDIA, 美国); 新生小牛血清 (四季青, 中国)。

1.2 色谱条件

将液相色谱仪上的右泵设置为上样泵, 进行在线 SPE 上样工作, 液相色谱仪上的左泵设置为分析泵, 流路系统的连接设置见图 1。 C_{18} 在线 SPE 柱 (4.6 mm×50 mm, 5 μm), Hypersil Green PAH 柱 (4.6 mm×150 mm, 3 μm), 柱温 30℃, 进样量 10 μL , 采用梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1; 荧光激发/发射波长 ($\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$) 切换

的时间程序见表2。

在线SPE阀切换时间:0~1.3 min,六通阀位置1-2,除去基质,排入废液;>1.3~30.5 min,六通阀位置1-6,转移PAHs至分析柱上;30.5 min以后,切回到六通阀位置1-2,右泵进行在线SPE柱再生与平衡,而此时左泵继续使目标物在分析柱上完成分离和定量过程。

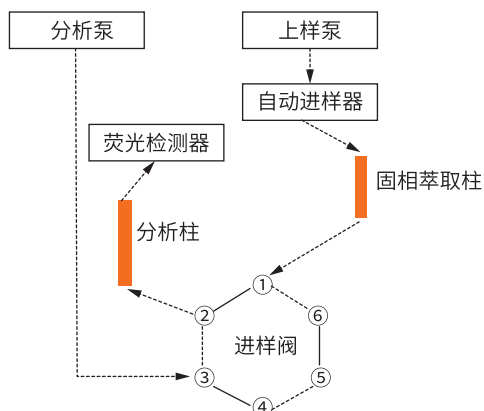


图1 在线固相萃取-液相色谱流路系统示意图

表1 多环芳烃梯度洗脱程序

上样泵				分析泵			
时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相		时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相	
		水 (%)	甲醇 (%)			水 (%)	甲醇 (%)
0.0	0.8	30	70	0.0	0.8	30	70
2.0	0.8	30	70	2.0	0.8	30	70
32.0	0.8	0	100	25.0	0.8	0	100
38.0	0.8	0	100	45.0	0.8	0	100
45.5	0.8	30	70	45.5	0.8	30	70

表2 荧光检测波长条件

切换时间 (min)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	多环芳烃	峰次序
0.0	260	330	萘	1
			蒽	2
			芴	3
15.7	245	365	菲	4
17.7	260	382	蒽	5
19.8	280	450	荧蒽	6
21.8	270	385	芘	7
23.5	260	400	苯并[a]蒽	8
			屈	9
			苯并[b]荧蒽	10
31.0	260	430	苯并[k]荧蒽	11
			苯并[a]芘	12
			双苯并[a, h]荧蒽	13
39.0	290	415	苯并[g, h, i]芘	14
43.6	305	480	茚并[1, 2, 3-cd]芘	15

1.3 方法条件优化

1.3.1 液相色谱条件的优化 采用PAHs分析专用柱,比较甲醇-水系统和乙腈-水系统对PAHs的分离效果,同时对流动相、柱温、流速等因素进行优化,并针对

各PAHs的保留时间,确定荧光波长切换程序。

1.3.2 SPE柱的选择及切阀程序的确定 比较Hypersep Hypercarb柱(3 mm×20 mm)、Dionex InGuard HRP柱(9 mm×24 mm)、Hypersep Retain PEP柱(3 mm×20 mm)以及C₁₈在线SPE柱(4.6 mm×20 mm, 5 μm)对PAHs的吸附效果与亲和力。选择适宜的SPE柱后,根据目标物和样品基质的保留时间确定切阀程序。

1.3.3 前处理方法的优化 本研究比较二氯甲烷、三氯甲烷和甲苯三种不含氧且与乙腈互溶的溶剂作为诱导剂时的诱导相变萃取效率。此外,无机盐的加入可能会对溶剂诱导相变萃取过程有一定的作用,因此,进一步采用4因素3水平正交试验考察乙腈、二氯甲烷以及无机盐氯化钠用量对萃取效率的影响。

1.4 方法学验证

1.4.1 工作曲线和检出限 用乙腈配制100.0 μg/L标准储备液,然后用乙腈稀释成50.00、10.00、1.00 μg/L标准溶液,再分别以小牛血清和纯水为基质配制工作曲线以比较方法的精密度。

将标准储备液用乙腈稀释成50.00、20.00、10.00、5.00、1.00 μg/L标准系列应用溶液。取6支聚四氟乙烯离心管,分别依次加入0.50 mL小牛血清、0.50 mL各标准系列应用溶液、0.05 mL二氯甲烷,密闭后涡旋5 min,10 000 r/min(离心半径9 cm)4℃离心10 min。取上清过0.22 μm滤膜后,直接上机分析。并用3倍信噪比计算检出限(limits of determination, LOD)。

1.4.2 方法的回收率和精密度 取小牛血清,添加15种PAHs混合标准溶液,分别制备得到5.00、10.00、30.00 μg/L的加标样品。每组设置6个平行样,计算相应的加标回收率。

1.4.3 方法应用 选取在本单位进行职业健康体检的8名熔炼岗位机械工人和6名普通工人的血样,采用所建立的方法测定体检剩余的血清样本中PAHs含量。

样品的采集和保存:采集人体血样约5 mL,当天分离血清后于-80℃保存。

样品处理:新鲜血清直接测定;冷冻血清置于4℃解冻,取出放至室温待测。准确吸取0.50 mL血清于聚四氟乙烯离心管中,加入0.50 mL乙腈和0.05 mL二氯甲烷,与工作曲线同法制备得到样品溶液。

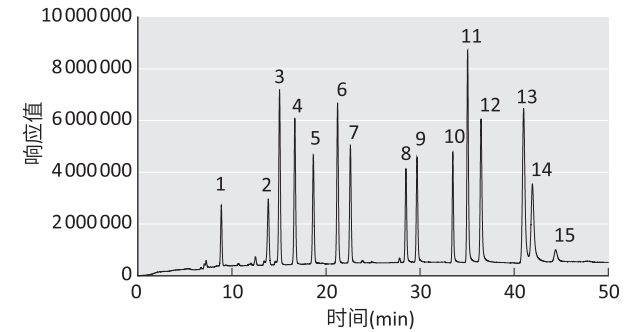
2 结果

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 液相色谱条件的优化 液相色谱条件优化结果

显示甲醇-水系统和乙腈-水系统均能使15种PAHs分离。乙腈系统的洗脱能力更强,在40 min内完成洗脱,但部分血中杂质会干扰低环类PAHs出峰;而甲醇系统对低环类PAHs的分离效果更好,且甲醇价格便宜、毒性更低。综合考虑分离效果、健康和经济的因素,故选择用甲醇-水洗脱系统。

为了提高血样的分离效果,对流动相、柱温、流速等因素进行优化;根据各物质的保留时间,设定荧光波长切换程序,使PAHs的出峰时间对应最优的荧光激发和发射波长,提高了PAHs的荧光检测灵敏度。由图2可见,该条件下血样中杂质峰及15种PAHs实现了良好的分离。



[注] 1. 萘; 2. 苊; 3. 芴; 4. 菲; 5. 蒽; 6. 荧蒽; 7. 芘; 8. 苯并[a]蒽; 9. 屈; 10. 苯并[b]荧蒽; 11. 苯并[k]荧蒽; 12. 苯并[a]芘; 13. 双苯并[a,h]荧蒽; 14. 苯并[g,h,i]芘; 15. 茚并[1,2,3-cd]芘。

图2 15种多环芳烃的荧光色谱图

2.1.2 SPE柱的选择及切阀程序的确定 通过筛选在线SPE柱,结果发现Hypersep Hypercarb柱、Dionex InGuard HRP柱及Hypersep Retain PEP柱对PAHs的亲合力太强,70%的甲醇无法使全部PAHs在短时间内完全洗脱。而C₁₈在线SPE柱,用70%的甲醇能使PAHs全部洗脱,且大部分血样基质在1.2 min前流出,PAHs在其后出峰,因此在1.3 min切阀能实现目标物与基质的完全分离。待全部PAHs转移至分析柱后,再次切阀使右泵对在线SPE柱进行冲洗和平衡,为下一次进样做好准备;同时左泵使目标物继续在分析柱上完成分离和定量过程。

2.2 前处理方法的优化

比较二氯甲烷、三氯甲烷和甲苯作为诱导剂的结果显示,3种诱导剂都可以达到高回收率,但仅二氯甲烷对所有PAHs出峰没有干扰,故选择二氯甲烷为诱导剂。此外,进一步采用4因素3水平正交试验考察了乙腈、二氯甲烷以及无机盐氯化钠的用量对溶剂诱导相变萃取过程的影响,结果显示乙腈0.50 mL、二氯甲烷0.05 mL及不用氯化钠时为最佳实验条件。

2.3 工作曲线和检出限

结果表明以小牛血清为基质的1.00、10.00、50.00 μg/L标准溶液的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.7%~4.7% (n=6),精密度好,工作曲线相关性好。

将各PAHs标准系列的峰面积(y)与质量浓度(x, μg/L)进行线性拟合,得到线性回归方程。15种PAHs在1.00~50.00 μg/L范围内线性关系良好。结果见表3。

表3 多环芳烃的线性回归方程和检出限

序号	多环芳烃	回归方程	决定系数(R ²)	检出限(μg/L)
1	萘	$\hat{y}=3.565\times10^4x+7.46\times10^2$	0.9996	0.10
2	苊	$\hat{y}=5.188\times10^4x+5.69\times10^3$	0.9999	0.09
3	芴	$\hat{y}=1.411\times10^5x+2.71\times10^2$	0.9999	0.02
4	菲	$\hat{y}=1.061\times10^5x+3.34\times10^3$	0.9999	0.02
5	蒽	$\hat{y}=8.845\times10^4x+1.79\times10^3$	0.9999	0.03
6	荧蒽	$\hat{y}=1.265\times10^5x+8.37\times10^2$	0.9999	0.03
7	芘	$\hat{y}=9.037\times10^4x+1.79\times10^3$	0.9999	0.04
8	苯并[a]蒽	$\hat{y}=7.265\times10^4x+2.11\times10^2$	0.9999	0.04
9	屈	$\hat{y}=8.348\times10^4x+1.33\times10^2$	0.9999	0.03
10	苯并[b]荧蒽	$\hat{y}=7.540\times10^4x+9.84\times10^2$	0.9999	0.03
11	苯并[k]荧蒽	$\hat{y}=1.664\times10^5x+2.53\times10^3$	0.9999	0.01
12	苯并[a]芘	$\hat{y}=1.392\times10^5x+1.51\times10^3$	0.9999	0.02
13	双苯并[a,h]荧蒽	$\hat{y}=1.912\times10^5x+3.43\times10^3$	0.9998	0.02
14	苯并[g,h,i]芘	$\hat{y}=1.065\times10^5x+3.52\times10^3$	0.9995	0.03
15	茚并[1,2,3-cd]芘	$\hat{y}=2.044\times10^4x+1.58\times10^3$	0.9999	0.20

2.4 方法的回收率和精密度

方法的回收率和精密度结果见表4。PAHs低、中、高组的加标回收率范围分别为91.3%~104.8%、90.8%~101.2%和93.2%~107.0%,RSD分别为1.6%~4.4%、1.8%~4.2%和1.6%~3.5%,表明方法准确度良好。

表4 方法的加标回收率和精密度 (n=6)

序号	多环芳烃	5.00 μg/L		10.0 μg/L		30.00 μg/L	
		回收率 (%)	标准偏差 (%)	回收率 (%)	标准偏差 (%)	回收率 (%)	标准偏差 (%)
1	萘	100.5	3.3	98.4	3.0	97.0	2.0
2	苊	97.0	2.9	96.4	3.0	95.7	2.0
3	芴	103.5	4.1	98.3	4.0	96.7	2.0
4	菲	93.6	3.3	96.8	3.5	98.5	2.6
5	蒽	99.9	4.1	97.5	4.2	95.5	2.3
6	荧蒽	101.1	2.5	96.1	2.9	96.6	1.6
7	芘	104.8	3.9	97.3	4.1	97.7	2.6
8	苯并[a]蒽	99.2	4.4	98.8	3.0	98.3	3.5
9	屈	98.0	3.5	97.3	3.2	99.2	1.9
10	苯并[b]荧蒽	96.2	3.6	95.6	2.6	98.5	1.9
11	苯并[k]荧蒽	96.9	1.6	94.2	2.6	97.3	1.8
12	苯并[a]芘	95.7	2.7	101.2	2.0	107.0	2.0
13	双苯并[a,h]荧蒽	91.3	3.4	90.8	1.8	95.2	2.0
14	苯并[g,h,i]芘	92.7	3.0	91.6	2.6	93.2	2.1
15	茚并[1,2,3-cd]芘	92.1	3.2	92.4	2.9	93.8	2.3

2.5 方法应用

检测结果表明萘、苊、芴、菲等低环 PAHs 的检出率较高,高环 PAHs 的检出率较低。普通人群检出前 7 种 PAHs,检出率为 33.3%~100%;机械工人检出率为 12.5%~100%,比普通人群多检出苯并[a]蒽、苯并[k]荧蒽、苯并[a]芘 3 种高环 PAHs。

表 5 研究人群血清中 PAHs 水平 (μg/L)

序号	多环芳烃	机械工人 (n=8)				普通人群 (n=6)			
		检出率 (%)	中位数	最小值	最大值	检出率 (%)	中位数	最小值	最大值
1	萘	75.0	1.1	ND	3.84	100	0.56	0.48	0.96
2	苊	100	1.64	0.26	3.34	100	0.31	0.20	1.19
3	芴	75.0	0.27	ND	0.41	100	0.16	0.14	0.42
4	菲	100	1.17	0.33	1.57	100	0.55	0.44	1.64
5	蒽	12.5	ND	ND	0.14	33.3	ND	ND	0.10
6	荧蒽	25.0	ND	ND	0.39	33.3	ND	ND	0.10
7	芘	75.0	1.14	ND	2.40	33.3	ND	ND	0.09
8	苯并[a]蒽	25.0	ND	ND	1.77	0	ND	ND	ND
9	屈	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
10	苯并[b]荧蒽	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
11	苯并[k]荧蒽	25.0	ND	ND	0.03	0	ND	ND	ND
12	苯并[a]芘	100	0.81	0.02	0.95	0	ND	ND	ND
13	双苯并[a,h]荧蒽	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
14	苯并[g,h,i]芘	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
15	茚并[1,2,3-cd]芘	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND

[注] ND 为未检出。

3 讨论

优化甲醇-水系统的梯度洗脱程序时,发现甲醇的初始比例低于 70% 会使高环 PAHs 的出峰时间明显延迟,严重影响实验效率;而甲醇初始比例过高,则会影响 PAHs 的分离效果。故在筛选在线 SPE 柱时,能用 70% 的甲醇洗脱全部 PAHs 是与液相系统顺利衔接的首要条件,其次要使 PAHs 和血样基质分离,这样才能满足构建有效在线 SPE-高效液相色谱系统的要求。筛选得到的 C₁₈ 在线 SPE 柱能使血样基质先于 PAHs 出峰,先通过切阀将基质部分排到废液中;第二次切阀将 PAHs 转入在线 SPE-高效液相色谱的串联流路中;待 PAHs 全部转移至分析柱上后,再次切阀使在线 SPE 柱和高效液相色谱系统并联,实现在线 SPE 柱的冲洗平衡和高效液相色谱系统继续分析的同时进行。

前期预实验结果显示,虽然 16 种 PAHs 在紫外区均有吸收,但采用紫外检测器同时检测时灵敏度较低;荧光检测器较紫外检测器具有灵敏度高、特异性强的优点,由于苊烯没有荧光效应,因此,选择荧光检测器只可测定血中 15 种 PAHs 的含量。扫描获取各

PAHs 的最大激发与发射波长,根据各 PAHs 的出峰时间,将荧光波长的切换程序分为 9 步,权衡每组中各 PAHs 的响应强度,设定最优荧光波长的时间切换程序,进一步提高了方法的灵敏度。

本研究首次将溶剂诱导相变萃取法成功应用于血中 PAHs 的前处理过程,只需几步简单操作,不需溶剂回收,快速实现血样的初步纯化分离及浓缩。根据文献报道采用溶剂诱导相变萃取法处理血样时,含氧溶剂不适合做诱导剂^[8],故选择考察了 3 种不含氧且与乙腈互溶的有机溶剂作为诱导剂。在溶剂诱导相变萃取法中,因为进样溶液为分相后的有机相,乙腈的用量是影响有机相体积的主要因素,所以在保证回收率的前提下使用乙腈越少,回收的有机相体积就越小,浓缩比越大,目标物的回收率就越高;但考虑到过滤操作便捷性,回收得到的有机相体积不宜小于 0.3 mL。同理,诱导剂二氯甲烷的体积越小,回收的有机相体积也越小,但二氯甲烷少于 0.03 mL 时,回收率明显下降。加氯化钠反而使回收率下降的原因,可能是盐析作用促蛋白沉淀,仅使有机相的体积增加,而未对目标物的分配起到明显的促进作用。

方法应用结果显示机械工人和普通人群中检测到的多为低环 PAHs,机械工人的暴露水平较低,中位数水平与普通人群无差异。与相关研究^[9]比较,本研究测得机械工人血中的 PAHs 检出率略低,且有 5 种高环 PAHs 未检测到。由于本研究测定的血样样本量少,工人接触 PAHs 种类少、浓度低,后期将选择典型的化工焦化企业将方法进行广泛的应用和生物监测。

综上,本研究通过优化溶剂诱导相变萃取条件、在线 SPE-高效液相色谱系统的色谱参数,建立了基于溶剂诱导相变萃取的在线 SPE-高效液相色谱方法,实现了血清中 15 种 PAHs 含量的准确测定。相比传统的血样前处理法和离线的 SPE 法,本法前处理简单,耗费有机溶剂量少,在 50 min 内测定的 PAHs 种类达 15 种,且采用荧光检测器达到了与质谱相近的灵敏度。本法具有简便高效、准确可靠及环境友好等优点,可为开展多环芳烃的暴露风险评估和毒理学研究提供一定的方法学支持。

参考文献

- [1] 丁昌明,郑磊,林少彬. 高效液相色谱法测定血清中的 9 种多环芳烃[J]. 卫生研究, 2012, 41 (5): 850-853.

(下转第 1070 页)

- [23] ITHAKISSIOS DS, GHAFGHAZI T, MENNEAR JH, et al. Effect of multiple doses of cadmium on glucose metabolism and insulin secretion in the rat [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1975, 31 (1) : 143-149.
- [24] KIM KE, SHI NY, EO MS, et al. THR-297 : impacts of heavy metal exposure on adiposity and pubertal development in Koran children and adolescents [EB/OL]. (2015-03-05) [2019-04-01]. <https://endo.confex.com/endo/2015endo/webprogram/Paper21251.html>.
- [25] SKALNAYA MG, TINKOV AA, DEMIDOV VA, et al. Hair toxic element content in adult men and women in relation to body mass index [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 161 (1) : 13-19.
- [26] PADILLA MA, ELOBEID M, RUDEN DM, et al. An examination of the association of selected toxic metals with total and central obesity indices : NHANES 99-02 [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7 (9) : 3332-3347.
- [27] KAWAKAMI T, NISHIYAMA K, KADOTA Y, et al. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein-null mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013, 272 (3) : 625-636.
- [28] HAN JC, PARK SY, HAH BG, et al. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 413 (2) : 213-220.
- [29] SIMMONS AL, SCHLEZINGER JJ, CORKEY BE. What are we putting in our food that is making us fat? Food additives, contaminants, and other putative contributors to obesity [J]. *Curr Obes Rep*, 2014, 3 (2) : 273-285.
- [30] FORAN CM, PETERSON BN, BENSON WH. Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2002, 133 (3) : 345-354.
- [31] AGUILAR M, BHUKET T, TORRES S, et al. Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012 [J]. *JAMA*, 2015, 313 (19) : 1973-1974.
- [32] MOON SS. Additive effect of heavy metals on metabolic syndrome in the Korean population : the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010 [J]. *Endocrine*, 2014, 46 (2) : 263-271.
- [33] NOOR N, ZONG G, SEELY EW, et al. Urinary cadmium concentrations and metabolic syndrome in U.S. adults : the national health and nutrition examination survey 2001-2014 [J]. *Environ Int*, 2018, 121 : 349-356.
- [34] LEE BK, KIM Y. Association of blood cadmium level with metabolic syndrome after adjustment for confounding by serum ferritin and other factors : 2008-2012 Korean national health and nutrition examination survey [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 171 (1) : 6-16.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 葛宏妍)

(上接第 1059 页)

- [2] 李欣欣, 崔师伟, 何民富, 等. 超高效液相色谱串联质谱检测生物样本中多环芳烃 [J]. *中国预防医学杂志*, 2012, 13 (4) : 246-250.
- [3] 陈小兰, 王斌, 王佳楣, 等. 北京市城区孕妇多环芳烃暴露水平及季节变化特征 [J]. *中国公共卫生*, 2016, 32 (1) : 113-117.
- [4] 郭勇勇, 霍霞, 吴库生, 等. 气相色谱-质谱联用法检测新生儿脐带血多环芳烃 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2010, 23 (2) : 68-70.
- [5] LIU G, ZHOU N, ZHANG M, et al. Hydrophobic solvent induced phase transition extraction to extract drugs from plasma for high performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217 (3) : 243-249.
- [6] 游钊, 朱岚, 何玲, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱法同时测定人尿液中 7 种多环芳烃代谢物 [J]. *分析化学*, 2014, 42 (12) : 1723-1728.
- [7] 刘丹华, 唐红芳, 刘绿叶, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱法测定人体尿液中的 N-乙酰-S-(N-甲基甲氨酰) 半胱氨酸 [J]. *分析化学*, 2014, 42 (12) : 1842-1845.
- [8] 张鸣嫔. 溶剂诱导相变萃取法在药物分离分析中的应用研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011.
- [9] 杨立新, 曾凡刚, 张晓娜, 等. 人血液中 16 种多环芳烃测定的固相萃取结合气相色谱-质谱法 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2019, 37 (2) : 139-143.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 韩凤婵, 汪源; 校对: 陈姣)