

钟慈平, 王颖, 何成军, 等. 螺旋藻中多环芳烃类新风险 QuEChERS 方法实证分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(7): 317-324. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070323

ZHONG Ciping, WANG Ying, HE Chengjun, et al. Empirical Analysis of QuEChERS Method for New Risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in *Spirulina*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(7): 317-324. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070323

· 分析检测 ·

螺旋藻中多环芳烃类新风险 QuEChERS 方法实证分析

钟慈平, 王 颖, 何成军, 杨超林, 伏 苓, 余晓琴*

(四川省食品药品检验检测院, 四川成都 610097)

摘 要:目的: 本研究旨在系统建立螺旋藻中多环芳烃气相色谱质谱联用仪 (GC-MS/MS) 分析方法, 实证分析螺旋藻中发现的多环芳烃类污染新风险。方法: 采用正己烷作为提取剂, 超声辅助提取 2 次, 合并提取液经 QuEChERS 净化, 氮吹浓缩过滤后测定。定性和定量: 使用 DB-5 MS 毛细管色谱柱分离, 多反应监测模式 (MRM) 结合基质匹配外标法分析。结果: 建立的气相色谱质谱联用方法回收率为 68.8%~101.9%, 相对标准偏差为 1.8%~8.4% (n=6), 在 1~32 ng/mL 线性范围内方程相关系数达到 0.999 以上, 方法的定量限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实证结果表明 69 批市售螺旋藻样品中全部检出多环芳烃, 含量分布在 2.4~3491 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围。结论: 本文建立的螺旋藻中 15 种多环芳烃 QuEChERS 检测方法快速、准确、灵敏度高, 可为日常监管提供科学的技术支撑, 通过样品的实证分析研究发现, 螺旋藻类产品中多环芳烃的风险需高度关注, 并进一步找出污染源建立防控措施。

关键词:螺旋藻, 多环芳烃, 气相色谱-质谱联用仪, 检测

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)07-0317-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021070323

本文网刊:



Empirical Analysis of QuEChERS Method for New Risks of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in *Spirulina*

ZHONG Ciping, WANG Ying, HE Chengjun, YANG Chaolin, FU Ling, YU Xiaoqin*

(Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu 610097, China)

Abstract: Objective: The purpose of this study was to systematically establish a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS/MS) analysis method for polycyclic aromatic hydrocarbons in *Spirulina*, and empirically analyze the new risk of polycyclic aromatic hydrocarbons found in *Spirulina*. Method: The polycyclic aromatic hydrocarbons of the sample were extracted twice with n-hexane ultrasonically, purified by QuEChERS, and tested after being concentrated by nitrogen blowing. Qualitative and quantitative: Separation using DB-5 MS capillary chromatographic column, multiple reaction monitoring mode (MRM) combined with matrix-matched external standard method for analysis. Results: The recovery rate was 68.8%~101.9%, the relative standard deviation was 1.8%~8.4% (n=6), the correlation coefficient of the equation reached above 0.999 within the linear range of 1~32 ng/mL, and the limit of quantitative (LOQ) was 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Polycyclic aromatic hydrocarbons were detected in all 69 commercially available *Spirulina* samples, with the content in the range of 2.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 3491 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Conclusion: The QuEChERS detection method for 15 polycyclic aromatic hydrocarbons in *Spirulina* established in this paper is fast, accurate and highly sensitive, and can provide scientific technical support for daily supervision. It is necessary to pay attention to the risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Spirulina* products, and further identify the source of pollution to establish prevention and control measures.

Key words: *Spirulina*; polycyclic aromatic hydrocarbons; gas chromatography-mass spectrometry; detection

收稿日期: 2021-07-27

基金项目: 四川省食品药品检验检测院基金项目 (2020-KYYL-010)。

作者简介: 钟慈平 (1990-), 男, 硕士, 中级工程师, 研究方向: 食品理化分析, E-mail: 646594253@qq.com。

* 通信作者: 余晓琴 (1979-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全分析检测与标准研究, E-mail: 113343838@qq.com。

螺旋藻是一种光自养原核低等水生植物,属于蓝藻纲颤藻科。因在显微镜下呈螺旋丝状而得名,广泛分布于热带和亚热带地区,如海洋、湖泊、温泉,特别是碱性湖。在人工控制下可在大型室外或温室中进行商业化生产,目前大规模人工培育的螺旋藻品种主要有钝顶螺旋藻、极大螺旋藻和印度螺旋藻三种^[1-3]。螺旋藻营养丰富全面且均衡,富含蛋白质、多肽、多糖、 γ -亚麻酸、维生素以及微量元素,脂肪和胆固醇含量较低^[4-6]。研究表明螺旋藻具有抗氧化^[7-8]、抗肿瘤^[9]、降血脂^[10-11]、抗病毒^[12]及降血糖^[13]等多种生物学活性,近年来螺旋藻作为一种潜在的药食两用资源受到越来越多的关注。

螺旋藻生长过程可能受水体环境的污染,特别容易吸收富集水体中的多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)^[14-15]。多环芳烃是一类含有两个或两个以上苯环或杂环以线状、角状或者簇状排列的中等级性或非极性有机化合物,自然界中广泛存在,具有疏水亲脂特性,易与矿物质、有机质结合,吸附在悬浮物和沉积物中,也易在生物体脂类中富集。PAHs 进入生物体后会经过一系列的代谢过程产生活性氧类物质,可与 DNA、蛋白质等形成化合物,破坏生物体的氧化防御系统而产生重大损伤,具有很强的致畸、致癌、致突变作用,已被世界各国列为优先控制污染物^[16-20]。目前多环芳烃的检测方法较多,主要涉及水产品^[21]、植物油^[22-23]、水果和蔬菜^[24]、肉制品^[25-26]、土壤^[27]和中药材^[28]等领域,检测技术多采用索氏提取、液液萃取、固相萃取、固相微萃取、QuEChERS 技术、凝胶渗透色谱净化结合高效液相色谱仪或气相色谱质谱联用仪等方式^[29-35]。但目前关于螺旋藻中多环芳烃检测方法研究很少,特别是多种多环芳烃化合物同时测定技术更鲜见报道。进出口预警信息跟踪过程中发现螺旋藻类产品多次由于苯并[a]芘或多环芳烃被通报或召回的信息,2015 年 10 月 EFSA 再次修订食品中的 BaP(苯并[a]芘)和 PAH4(苯并[a]芘、苯并[a]蒽、苯并[b]荧蒽和蒽)的最大限度规定(苯并[a]芘限量修订为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, PAH4 限量修订为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$),增列含有螺旋藻的食品补充剂中多环芳烃的限量要求。随着螺旋藻功能因子深入研究,相关保健食品的开发应用也呈现爆发式增长(自 1997 年至 2019 年,已批准藻类保健食品 342 个,占总批准产品数量的 1.9%^[36]),因此非常有必要系统性的开展螺旋藻中多环芳烃方法研究和含量分析,及时准确地获得多环芳烃风险暴露情况,为消费者合理膳食消费提供指导。

本研究旨在通过对提取试剂、净化条件及色谱质谱分析条件的选择和优化,建立 QuEChERS-GC-MS/MS 对螺旋藻中 15 种多环芳烃的检测方法,并结合基质匹配外标法分析消除基质效应,实现准确定量。使用 QuEChERS 前处理快速高效,能够满足实验室快速检测分析的需要,可为螺旋藻多环芳烃污染的质量安全监管提供便利。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

螺旋藻保健品、螺旋藻原料 购自全国各地药店;多环芳烃 标准品(浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),天津阿尔塔科技有限公司;N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)吸附剂、十八烷基键合硅胶吸附剂(C_{18})

天津博纳艾杰尔科技公司;二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、环己烷、乙腈、正己烷 色谱纯,美国 Fisher Chemical 公司。

TQ 8050 气相色谱-质谱联用仪 日本 SHIMADZU 公司;ML-204 电子天平 METTLER TOLEDO 公司;KQ-500DE 超声仪 江苏昆山超声仪器公司;MULTIFUGEX3R 离心机 美国 Thermo Fisher 公司;N1 全自动氮吹浓缩仪 上海屹尧仪器科技发展有限公司;T25 Digital 涡旋振荡仪 德国 IKA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

1.2.1.1 提取 称取 1 g 粉碎研细的样品于 50 mL 离心管中,准确加入 10 mL 正己烷,涡旋振荡提取 10 min,超声提取 10 min,以 8000 r/min 离心 5 min,收集上清液;再加入 10 mL 正己烷重复以上步骤提取 1 次,合并 2 次上清液,混匀后待净化。

1.2.1.2 QuEChERS 净化 精密吸取上述提取液 5 mL 于 10 mL 离心管中,加入 100 mg C_{18} 和 100 mg PSA 粉末,涡旋 60 s 后 8000 r/min 离心 5 min,吸取所有上清液在氮吹浓缩仪上以 40 $^{\circ}\text{C}$ 的温度氮吹至近干,正己烷准确定容至 1.0 mL,过 0.22 μm 滤膜待气相色谱-串联质谱分析。

1.2.2 标准溶液的配制 多环芳烃储备液:精密吸取多环芳烃标准品 1 mL 至 25 mL 容量瓶中,正己烷定容至刻度,摇匀即得多环芳烃储备液(浓度为 4000 ng/mL)。

多环芳烃使用液:精密吸取多环芳烃储备液 0.1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用正己烷定容至刻度,摇匀后即得多环芳烃使用液(浓度为 40 ng/mL)。

1.2.3 仪器条件

1.2.3.1 气相色谱条件 色谱柱:Agilent J&W DB-5 MS 石英毛细柱(30 m $\times$ 0.25 mm,0.25 μm);进样口温度:300 $^{\circ}\text{C}$;升温程序:70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min,以 35 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 160 $^{\circ}\text{C}$,以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 260 $^{\circ}\text{C}$,以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 310 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min;载气(He)流速:1.5 mL/min,进样量:1 μL ;不分流进样。

1.2.3.2 质谱条件 电子轰击离子源;电子能量 70 eV;离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$;传输线温度:310 $^{\circ}\text{C}$;溶剂延迟时间:4 min;数据采集采用多反应监测模式(MRM)。

1.2.3.3 定性及定量方法 准确吸取上述 1.2.2 中多环芳烃使用液适量,用同法处理的阴性样品基质溶液配制成 1~32 ng/mL 的系列标准溶液(现配现用),

GC-MS/MS 气相色谱-质谱联用仪多反应监测模式测定,以多环芳烃浓度(ng/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 样品测定 将 1.2.1 中处理的试样待测液注入气相色谱-质谱仪中,测得相应的峰面积,根据标准曲线得到试样待测液中多环芳烃的质量浓度。如果试样待测液中多环芳烃化合物的响应值超出仪器检测的线性范围,可适当稀释后测定。

1.3 数据处理

使用仪器自带数据处理软件(GCMS solution 版本 4.45)定性定量。

2 结果与分析

2.1 质谱参数优化

优化碰撞能量,筛选高响应特异离子(例如部分样品中苯并(a)蒽 226.10>224.10 峰前有明显杂质干扰,影响定性结果,优化为 228.10>224.10),采用多反应监测模式 23 min 内完成对 15 种多环芳烃目标物的同时测定。具体优化后的 15 种多环芳烃总离子流图见图 1,质谱参数结果见表 1。

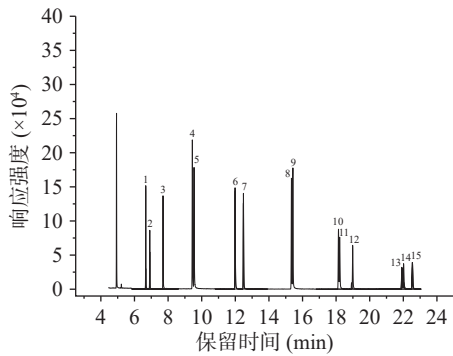


图 1 15 种多环芳烃化合物的总离子流图
Fig.1 Total ion chromatograms of 15 PAHs
注:图中 1~15 对应的化合物与表 1 中相同。

2.2 提取试剂和提取次数优化

PAHs 极性较弱,为脂溶性化合物,螺旋藻基质复杂,干扰物质(如:蛋白质、色素、脂肪等大分子物质)较多。为尽可能降低基质干扰,实验对比了环己烷、乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、乙腈和丙酮 6 种有机试剂对提取效果的影响。在螺旋藻样品中加入多环芳烃混标溶液模拟阳性质控样,称取 1 g 试样分别使用上述 6 种有机试剂提取。10 mL 提取一次时,二氯甲烷提取效率最高,但提取溶液颜色最深且提取液不易分层。当采用 10 mL 试剂提取两次时,丙酮、正己烷、乙酸乙酯、环己烷的提取效率与二氯甲烷接近,乙腈提取效率相对偏低(见图 2)。同时比较提取液颜色深浅和提取效率,最终选用正己烷作为提取试剂。

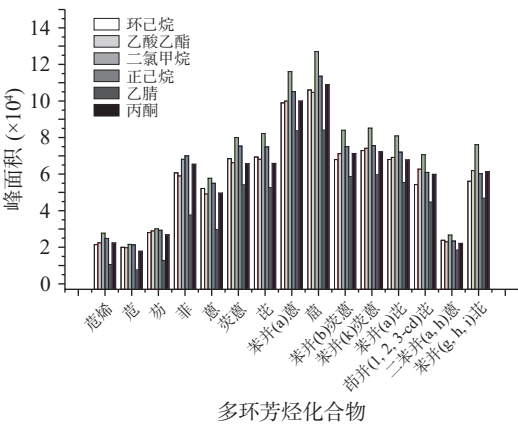


图 2 不同溶剂对螺旋藻中多环芳烃的提取效率
Fig.2 Different solvents extraction efficiency of PAHs in *Spirulina*

2.3 超声辅助提取优化

为了考察超声提取技术对提取效率的影响,本实验在螺旋藻样品中加入多环芳烃混标溶液模拟阳性质控样,称取 1 g 试样采用正己烷 10 mL 分别超

表 1 15 种多环芳烃的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters for 15 PAHs

序号	化合物	CAS	定量离子对		定性离子对1		定性离子对2		保留时间(min)
			m/z	碰撞能量(eV)	m/z	碰撞能量(eV)	m/z	碰撞能量(eV)	
1	萘烯	208-96-8	152.10>150.10	28	152.10>126.10	28	152.10>102.10	28	6.692
2	萘	83-32-9	153.10>151.10	28	153.10>127.10	28	151.10>77.00	20	6.930
3	芴	86-73-7	165.10>163.10	28	165.10>115.10	28	165.10>139.10	28	7.723
4	菲	85-01-8	178.10>152.10	20	178.10>176.10	28	176.10>150.10	20	9.476
5	蒽	120-12-7	178.10>152.10	20	178.10>176.10	28	176.10>150.10	20	9.579
6	荧蒽	206-44-0	202.10>200.10	30	200.10>198.10	30	202.10>152.10	28	12.021
7	芘	129-00-0	202.10>200.10	30	202.10>152.10	28	200.10>198.10	30	12.517
8	苯并(a)蒽	56-55-3	228.10>226.10	32	228.10>224.10	32	228.10>202.10	60	15.381
9	蒎	218-01-9	228.10>226.10	32	226.10>224.10	32	228.10>202.10	60	15.466
10	苯并(b)荧蒽	205-99-2	252.10>250.10	36	250.10>248.10	36	252.10>226.10	60	18.195
11	苯并(k)荧蒽	207-08-9	252.10>250.10	36	250.10>248.10	36	252.10>248.10	60	18.272
12	苯并(a)芘	50-32-8	252.10>250.10	36	250.10>248.10	36	252.10>226.10	60	19.046
13	茚并(1, 2, 3-cd)芘	193-39-5	276.10>274.10	36	276.10>272.10	60	274.10>272.10	36	21.975
14	二苯并(a, h)蒽	53-70-3	278.10>276.10	36	278.10>274.10	60	276.10>274.10	36	22.081
15	苯并(g, h, i)花	191-24-2	276.10>274.10	36	274.10>272.10	36	276.10>272.10	60	22.608

声和未超声提取两次(见图3),结果显示蒽、苯并(b)蒽、苯并(k)蒽、苯并(a)蒽、茚并(1,2,3-cd)蒽、二苯并(a,h)蒽和苯并(g,h,i)茈等化合物在超声辅助提取条件下的提取效果优于未超声提取。

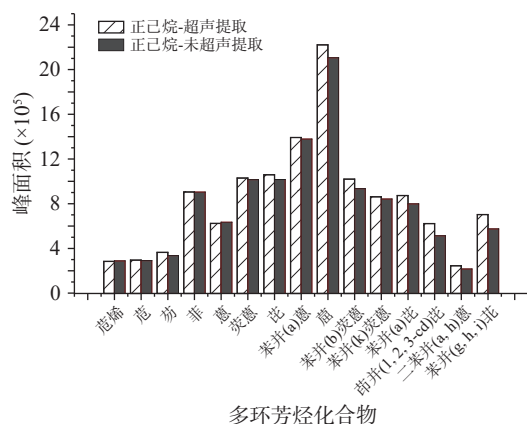


图3 超声提取对螺旋藻中多环芳烃的提取效率影响

Fig.3 Effect of ultrasonic extraction on the extraction efficiency of PAHs in *Spirulina*

2.4 净化方式优化

2.4.1 固相萃取和 QuEChERS 净化 通过查阅文献^[15,37-38]和参考 GB 5009.265-2016《食品安全国家标准食品中多环芳烃的测定》,本实验选用了中性氧化铝、亲水亲脂平衡 HLB 萃取柱、C₁₈、高分子印迹多环芳烃专用萃取柱 MIPs、Florsil 固相萃取小柱和 QuEchERS 共 6 种净化方式(见图4)。结果显示,C₁₈和中性氧化铝基本对 15 种多环芳烃没有保留能力,HLB、多环芳烃专用萃取柱 MIPs、Florsil 固相萃取小柱和 QuEchERS 净化具有较好的回收率,但 HLB 和多环芳烃专用萃取柱 MIPs 对色素净化效果较差,净化后的上机溶液色素依然较多,对 GC-MS/MS 系统的耐用性提出挑战。Florsil 固相萃取小柱和 QuEchERS 净化回收率较高,除去杂质尤其是色素能力强,满足实验要求,考虑到方法的操作方便性和耗材成本,最终选用操作更简便、成本更低廉的 QuEchERS 净化方式。

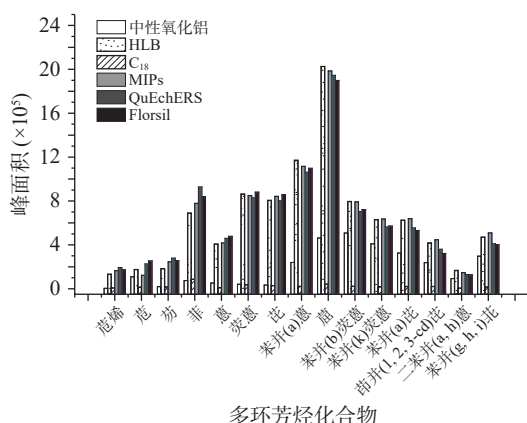


图4 不同方式对螺旋藻中多环芳烃的净化效率

Fig.4 Purification efficiency of PAHs in *Spirulina* by different methods

2.4.2 QuEChERS 填料含量优化

目前 QuEChERS

法中常用的吸附净化剂有 PSA(N-丙基乙二胺)、C₁₈(十八烷基键合硅胶吸附剂)和 GCB(石墨碳黑粉)3 种。GCB 的表面具有正六元环结构,对平面分子有极强的亲和力,能有效去除螺旋藻基质中的色素和甾醇类干扰物,但由于多环芳烃结构中含有平面芳香环,也会被不同程度吸附,导致 PAHs 加标回收率降低,实际检测中无法实现准确定量。PSA 结构中含有两个氨基,通过氢键的形成或离子交换作用,可有效去除样品中糖、色素、脂肪酸及其它有机酸等;C₁₈ 主要去除非极性干扰物,例如油脂。本实验对比了不同含量的 PSA 粉和 C₁₈ 粉对螺旋藻中多环芳烃净化的效果(见图5)。结果显示,QuEChERS 净化没有带来多环芳烃化合物明显的损失,PSA 粉和 C₁₈ 粉对色素的净化效果比较明显,随着二者含量的增加,色素含量逐步降低。但同时菲的响应值逐步升高,引入了对菲的二次污染,考虑到除杂和二次污染之间的平衡,最终选用了 PSA 粉和 C₁₈ 粉各 100 mg 的含量作为净化方式。

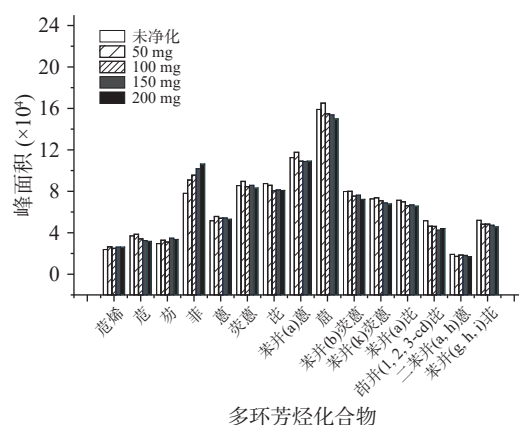


图5 不同含量的 PSA 和 C₁₈ 对螺旋藻中多环芳烃的净化效率

Fig.5 Purification efficiency of PAHs in *Spirulina* by different contents of PSA and C₁₈

2.5 方法的基质效应评估

气相色谱-质谱联用分析过程中会遇到基质效应,样品中除目标物之外的其他成分对目标物的响应带来抑制或增强,最终影响结果的准确性。本实验通过基质匹配法考察基质效应,取螺旋藻(阴性样品)按照 1.2.1 节前处理,使用提取净化后的空白基质溶液配制基质标准曲线,同时使用正己烷溶剂配制同样浓度的标准曲线。将所得两条校准曲线的斜率按下式计算得到绝对基质效应:

$$\text{基质效应}(\%) = \frac{S_m}{S_s} \times 100$$

式中: S_m 为基质配制的校准曲线斜率; S_s 为纯溶剂配制的校准曲线斜率。若基质效应小于 100%,则存在基质抑制效应,若基质效应大于 100%,则存在基质增强效应。

由表2可以看出,出峰较早的范烯、苊、苝、菲、蒽、苯并(a)蒽的基质效应偏差均在 10% 以内,响应

受到基质影响较小, 定量准确性较为稳定; 但出峰较晚的苯并(a)蒽、蒎、苯并(b)荧蒽、苯并(k)荧蒽、苯并(a)芘、茚并(1, 2, 3-cd)芘、二苯并(a, h)蒽和苯并(g, h, i)芘的响应受到基质影响较大, 具有明显的基质增强效应, 因此定量时需要采用空白基质匹配外标法定量, 以此消除基质效应带来的定量偏差, 保证结果的准确性。

表 2 螺旋藻中多环芳烃定量分析的基质效应
Table 2 Matrix effect of quantitative analysis of PAHs in *Spirulina*

编号	化合物	基质配制的校准 曲线斜率: Sm	纯溶剂配制的校准 曲线斜率: Ss	基质效应 (%)
1	萘烯	2501.933	2535.003	98.7
2	萘	1900.358	1966.806	96.6
3	芴	2774.097	2892.63	95.9
4	菲	6055.434	6205.823	97.6
5	蒽	5083.664	4952.53	102.6
6	荧蒽	7182.905	6885.475	104.3
7	芘	7077.939	6834.102	103.6
8	苯并(a)蒽	9363.846	8455.756	110.7
9	蒎	9606.246	8885.886	108.1
10	苯并(b)荧蒽	6486.13	5615.74	115.5
11	苯并(k)荧蒽	5986.21	5182.756	115.5
12	苯并(a)芘	5349.769	4507.589	118.7
13	茚并(1, 2, 3-cd)芘	3385.811	2921.115	115.9
14	二苯并(a, h)蒽	3932.203	3074.073	127.9
15	苯并(g, h, i)芘	4065.72	3569.786	113.9

2.6 方法的线性范围、定量限结果

由于螺旋藻样品测定过程中存在明显基质效应, 本方法以阴性螺旋藻样品提取液作为溶剂, 采用基质匹配外标法定量。配制 1、2、4、8、16、32 ng/mL 基质混合标准液, GC-MS/MS 采集数据并以多环芳烃浓度(ng/mL)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标

表 3 15 种多环芳烃的回归方程、相关系数、定量限
Table 3 Regression equation, correlation coefficient and LODs of 15 PAHs

编号	化合物	回归方程	相关系数 r	定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
1	萘烯	$Y=2501.933X+1344.625$	0.99997	2
2	萘	$Y=1900.358X+7235.572$	0.99972	2
3	芴	$Y=2774.097X+6584.985$	0.99971	2
4	菲	$Y=6055.434X+30892.78$	0.99966	2
5	蒽	$Y=5083.664X+4820.363$	0.99969	2
6	荧蒽	$Y=7182.905X+8168.333$	0.99989	2
7	芘	$Y=7077.939X+6622.308$	0.99980	2
8	苯并(a)蒽	$Y=9363.846X+4511.279$	0.99981	2
9	蒎	$Y=9606.246X+9947.418$	0.99984	2
10	苯并(b)荧蒽	$Y=6486.13X+3258.801$	0.99986	2
11	苯并(k)荧蒽	$Y=5986.21X+2883.791$	0.99995	2
12	苯并(a)芘	$Y=5349.769X+1798.592$	0.99986	2
13	茚并(1, 2, 3-cd)芘	$Y=3385.811X+2306.985$	0.99961	2
14	二苯并(a, h)蒽	$Y=3932.203X+1914.04$	0.99976	2
15	苯并(g, h, i)芘	$Y=4065.72X+1157.607$	0.99993	2

准曲线。如表 3 所示, 15 种多环芳烃在 1~32 ng/mL 含量范围内, 质量浓度与其峰面积呈良好的线性关系, 线性相关系数均在 0.999 以上。定量限为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.7 方法的回收率与精密度

按照 4 倍定量限和 10 倍定量限的添加水平, 在螺旋藻中添加适当体积的多环芳烃混合标准溶液, 采用 1.2.1 节前处理方法平行测定 6 次, 计算回收率和 RSD(见表 4)。15 种多环芳烃添加量为 8 和 20 $\mu\text{g/kg}$ 时, 回收率范围在 68.8%~101.9%, 相对标准偏差在 1.8%~8.4%($n=6$)之间, 方法具有较好的回收率和重复性。

表 4 15 种多环芳烃的回收率与精密度($n=6$)
Table 4 Recoveries and relative standard deviations(RSDs) of 15 PAHs($n=6$)

化合物	加标水平($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率(%)	RSD(%)
萘烯	8	83.2	3.3
	20	71.2	2.7
萘	8	89.6	5.5
	20	80.9	5.2
芴	8	89.7	8.4
	20	83.6	4.2
菲	8	89.7	5.5
	20	95.0	6.8
蒽	8	86.7	3.9
	20	91.1	3.8
荧蒽	8	94.9	4.3
	20	101.2	2.3
芘	8	92.5	3.2
	20	99.4	4.0
苯并(a)蒽	8	89.6	2.4
	20	99.6	2.6
蒎	8	93.2	3.1
	20	101.9	3.3
苯并(b)荧蒽	8	88.2	5.5
	20	93.5	2.8
苯并(k)荧蒽	8	85.9	7.2
	20	94.4	3.1
苯并(a)芘	8	87.2	3.4
	20	93.7	2.5
茚并(1, 2, 3-cd)芘	8	68.8	7.3
	20	82.8	4.0
二苯并(a, h)蒽	8	86.5	3.5
	20	88.3	3.4
苯并(g, h, i)芘	8	83.4	6.2
	20	85.0	1.8

2.8 实际样品测定结果

运用建立的检测方法, 对实际样品进行分析。从市场随机抽取螺旋藻类保健品 69 批次, 含量分析见表 5。结果显示 15 种多环芳烃在 69 批次螺旋藻中均有检出, 检出率为 100%, 含量分布在 2.4 ~ 3491 $\mu\text{g/kg}$ 范围内, 特别是菲、蒽、荧蒽、芘、苯并(a)蒽、蒎、苯并(b)荧蒽和苯并(a)芘等化合物检出率较高, 含量比其他多环芳烃相比也明显偏高。全试剂空白总离子流图和螺旋藻中多环芳烃总离子流图分别见图 6 和图 7。

3 结论

本研究通过对提取试剂、净化条件及色谱质谱

表 5 69 批次螺旋藻中 15 种多环芳烃检测结果汇总

Table 5 Summary of analytical results for the determination of 15 PAHs in 69 batches of *Spirulina*

编号	化合物	检出批次	检出率(%)	检出范围($\mu\text{g/kg}$)
1	萘	41	59	5.9~542
2	苊	69	100	8.4~48.5
3	苊	65	94	3.0~374
4	菲	67	97	4.8~2418
5	蒽	63	91	2.4~786
6	荧蒽	63	91	4.6~3390
7	芘	63	91	3.3~3491
8	苯并(a)蒽	48	70	2.4~932
9	蒽	59	86	2.6~893
10	苯并(b)荧蒽	59	86	2.5~975
11	苯并(k)荧蒽	27	39	2.6~370
12	苯并(a)芘	36	52	2.6~744
13	茚并(1,2,3-cd)芘	28	41	3.2~584
14	二苯并(a,h)蒽	16	23	3.2~56.9
15	苯并(g,h,i)芘	35	51	3.8~633

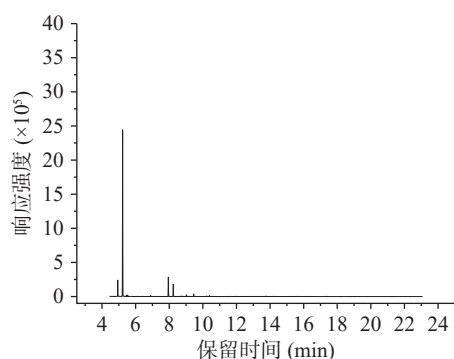


图 6 全试剂空白总离子流图

Fig.6 Total ion chromatograms of full reagent blank

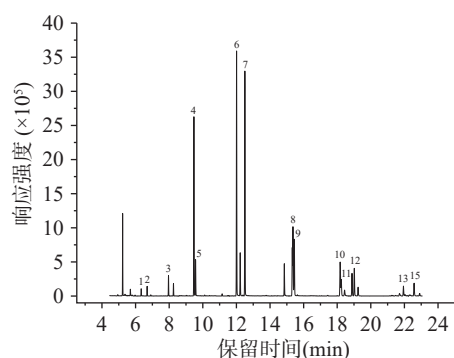


图 7 螺旋藻中多环芳烃总离子流图

Fig.7 Total ion chromatograms of PAHs in *Spirulina*

分析条件的选择和优化,建立了 QuEChERS-GC-MS/MS 对螺旋藻中 15 种多环芳烃的检测方法。最终采用正己烷结合超声辅助提取 2 次,使用 QuEChERS (100 mg PSA 和 100 mg C_{18}) 方式净化,氮吹浓缩后多反应监测模式(MRM)测定。结合基质匹配外标法分析消除基质效应,实现了准确定量。该方法回收率为 68.8%~101.9%,相对标准偏差为 1.8%~8.4%($n=6$),在 1~32 ng/mL 线性范围内方程相关系数达到 0.999 以上,精密度和准确性良好,使用 QuEChERS 前处理

快速高效,节省了检测成本和检测时间,能够满足实验室快速检测分析的需要,可为螺旋藻多环芳烃污染的质量安全监管提供便利。同时,运用建立的方法对市售 69 批次螺旋藻样品进行了测定,结果显示多环芳烃检出率和含量水平均处于较高水平,这需要引起广大生产企业、监管者以及消费者的高度重视,在加工原料和生产工艺等环节进一步找出污染源并建立防控措施。

参考文献

- [1] 何善生,王力,李健,等.螺旋藻研究进展[J].食品工业,2017(12):263-268. [HE Shansheng, WANG Li, LI Jian, et al. Advances in *Spirulina* research[J]. The Food Industry, 2017(12): 263-268.]
- [2] 潘子康,胡丽莉.螺旋藻的化学成分、生物学活性和应用范围的研究概述[J].生物学教学,2020,45(2):2-3. [PAN Zikang, HU Lili. Study overview of the chemical constituent biological activity and application scope of *Spirulina*[J]. *Biology Teaching*, 2020, 45(2): 2-3.]
- [3] 丛林,朱静华,张兆臣.浅谈螺旋藻的功效和使用[J].田径,2020(10):84. [CONG Lin, ZHU Jinghua, ZHANG Zhaocheng. Study on the efficacy and use of *Spirulina*[J]. *Track and Field*, 2020(10): 84.]
- [4] ZHENG Yi, ZHU Fan, LIN Dan, et al. Optimization of formulation and processing of *Moringa oleifera* and *Spirulina* complex tablets[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2016, 24(1): 122-126.
- [5] ZHOU Ting, WANG Jingjing, ZHENG Hongli, et al. Characterization of additional zinc ions on the growth, biochemical composition and photosynthetic performance from *Spirulina platensis*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 269: 285-291.
- [6] RAMESH G. Chapter 42-*Spirulina*[J]. *Nutraceuticals*, 2016: 569-583.
- [7] GAD A S, KHADRAWY Y A, EL-NEKEETY A A, et al. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats[J]. *Nutrition*, 2011, 27(5): 582-589.
- [8] RAJASEKAR P, PALANISAMY S, ANJALI R, et al. Isolation and structural characterization of sulfated polysaccharide from *Spirulina platensis* and its bioactive potential: *In vitro* antioxidant, antibacterial activity and zebrafish growth and reproductive performance[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 141: 809-821.
- [9] PARDHASARADHI B V V, ALI A M, KUMARI A L, et al. Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS[J]. *Mol Cancer Therapeutics*, 2003, 2(11): 1165-1170.
- [10] PAK W, TAKAYAMA F, MINE M, et al. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Spirulina* on rat model of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition*, 2012, 51(3): 227-234.
- [11] SERBAN M, SAHEBKAR A, DRAGAN S, et al. A systematic review and meta-analysis of the impact of *Spirulina* supplementation on plasma lipid concentrations[J]. *Clinical Nutrition*, 2016, 35(4): 842-851.

- [12] DANANJAYA S H S, THU THAO N T, WIJERATHNA H M S M, et al. *In vitro* and *in vivo* anticandidal efficacy of green synthesized gold nanoparticles using *Spirulina* maxima polysaccharide [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 92: 138–148.
- [13] 于蕾妍, 隋君霞, 李华涛, 等. 螺旋藻多糖与银杏叶提取物复方对四氧嘧啶模型小鼠的降血糖作用 [J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46(7): 2176–2182. [YU Leiyan, SUI Junxia, LI Huatao, et al. Hypoglycemic effect of polysaccharide from *Spirulina platensis* and *Ginkgo biloba* extract compound on alloxan-induced model mice [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(7): 2176–2182.]
- [14] 陈祥明, 张聪, 王丹红, 等. 基于巯基-烯点击化学法的磁纳米粒子制备及用于螺旋藻中多环芳烃的分析 [J]. *分析试验室*, 2016, 35(11): 1290–1294. [CHEN Xiangming, ZHANG Cong, WANG Danghong, et al. Synthesis of Fe_{30_4}@DA-L magnetic composites by using thiol-ene click chemistry for extraction of PAHs in *Spirulina* samples [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2016, 35(11): 1290–1294.]
- [15] 郑香平, 张春, 丁立平, 等. 高效液相色谱-荧光检测法测定螺旋藻中苯并[a]芘残留 [J]. *分析科学学报*, 2015, 31(5): 709–712. [ZHENG Xiangping, ZHANG Chun, DING Liping, et al. Determination of Benzo[a]pyrene in *Spirulina* by high performance liquid chromatography-fluorescence detection [J]. *Journal of Analytical Science*, 2015, 31(5): 709–712.]
- [16] 李荫, 柳叶, 孙晓伟, 等. 多环芳烃的样品前处理技术研究进展 [J]. *环境化学*, 2015, 34(8): 1460–1469. [LI Yin, LIU Ye, SUN Xiaowei, et al. Research progress on sample pretreatment techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Environmental Chemistry*, 2015, 34(8): 1460–1469.]
- [17] 路杨, 刘印平, 王丽英, 等. 高风险食品中多环芳烃含量调查与分析 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(18): 6608–6613. [LU Yang, LIU Yinping, WANG Liying, et al. Investigation and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons content in high risk food [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(18): 6608–6613.]
- [18] TEREZA S, ANNA S R, ADÉLA F, et al. Application of QuEChERS-EMR-Lipid-DLLME method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food of animal origin [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 87: 103420.
- [19] 段小丽. 多环芳烃污染的人体暴露和健康风险评价方法 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2011. [DUAN X L. Human exposure and health risk assessment method of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 2011.]
- [20] 杨丹丹, 史永富, 黄宣运, 等. 水产品中多环芳烃检测技术研究进展 [J]. *食品工业*, 2018, 39(11): 259–262. [YANG Dandan, SHI Yongfu, HUANG Xuanyun, et al. Research progress of polycyclic aromatic hydrocarbon detection techniques in aquatic products [J]. *The Food Industry*, 2018, 39(11): 259–262.]
- [21] 杨丹丹, 韩峰, 史永富, 等. 高效液相色谱-紫外/荧光测定贝类体内 16 种多环芳烃 [J]. *分析试验室*, 2019, 38(7): 828–833. [YANG Dandan, HAN Feng, SHI Yongfu, et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in shellfish by HPLC-VWD/FLD [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2019, 38(7): 828–833.]
- [22] 周华, 张蕴, 张喆骅, 等. 高分子印迹固相萃取技术结合 GC/MS 法测定食用油中 16 种多环芳烃 [J]. *卫生研究*, 2016, 45(6): 957–962. [ZHOU Hua, ZHANG Yun, ZHANG Zhehua, et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils by gas chromatography-mass spectrometry combined with molecularly imprinted solid phase extraction [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2016, 45(6): 957–962.]
- [23] 陈曼, 何明, 郭妍婷, 等. 烟熏油炸食品及食用油中 PAHs 的检测及控制方法研究进展 [J]. *仲恺农业工程学院学报*, 2017, 30(3): 65–71. [CHEN Man, HE Ming, GUO Yanting, et al. Research progress on detection and control of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fried foods and edible oils [J]. *Journal of Zhongkai University of Agriculture and Technology*, 2017, 30(3): 65–71.]
- [24] 王钟, 何漪, 王敏, 等. 高效液相色谱法测定蔬菜和水果中 15 种欧盟优控多环芳烃 [J]. *食品研究与开发*, 2019, 49(17): 178–182. [WANG Zhong, HE Yi, WANG Min, et al. Determination of 15 European priority controlled polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetables and fruits by high performance liquid chromatography [J]. *Food Research and Development*, 2019, 49(17): 178–182.]
- [25] 彭姚珊, 李永利, 陈鹰, 等. 气相色谱-同位素稀释质谱法测定肉中多环芳烃含量 [J]. *食品科学*, 2019, 40(12): 321–325. [PENG Yaoshan, LI Yongli, CHEN Ying, et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in meat samples by gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry approach [J]. *Food Science*, 2019, 40(12): 321–325.]
- [26] 沈习习, 汤晓艳, 战俊良, 等. 烧烤肉中多环芳烃的检测方法及控制措施 [J]. *中国食物与营养*, 2019, 25(11): 21–25. [SHEN Xixi, TANG Xiaoyan, ZHAN Junliang, et al. Research progress in testing standards and control technologies of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grilled meat products [J]. *Food and Nutrition in China*, 2019, 25(11): 21–25.]
- [27] 张雯, 冉婷. 加速溶剂-固相萃取-气相色谱质谱法测定土壤中多环芳烃 [J]. *建材与装饰*, 2020(120): 119–120. [ZHANG Wen, RAN Ting. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil using accelerated solvent extraction and solid phase extraction with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Construction Materials & Decoration*, 2020(120): 119–120.]
- [28] 安徽省检验检疫科学技术研究院. DB 34/T 3304-2018 中草药中 16 种多环芳烃的测定气相色谱质谱法 [S]. 安徽: 安徽省市场监督管理局, 2018. [Anhui Institute of Inspection and Quarantine Science and Technology. DB 34/T 3304-2018 Determination of 16 sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese medicinal herbs- GC/MS method [S]. Anhui: Anhui Provincial Bureau of Market Supervision, 2018.]
- [29] PENA T, PENSADO L, CASAIS C, et al. Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1121(2): 163.

- [30] PFANNKUCH E A, STUFF J R, WHITECAVAGE J A, et al. A high throughput method for measuring polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood using QuEChERS extraction and SBSE[J]. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015: 359629.
- [31] SONG Xingliang, LI Jinhua, XU Shoufang, et al. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2012, 99(18): 75.
- [32] RASCÓN A J, AZZOUZ A, BALLESTEROS E. Trace level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in raw and processed meat and fish products from European markets by GC-MS[J]. *Food Control*, 2019, 101: 198–208.
- [33] LEE Y N, LEE S, KIM J S, et al. Chemical analysis techniques and investigation of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruit, vegetables and meats and their products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 277: 156–161.
- [34] ABOU-ARAB A A K, ABOU-DONIA M A M, EL-DARS F, et al. Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in smoked and sun-dried fish samples from areas in Lake Victoria in Mwanza, Tanzania[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 73: 39–46.
- [35] LU F, GUNTER K K, CHENG Q F. Heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial ready-to-eat meat products on UK market[J]. *Food Control*, 2017, 73: 306–315.
- [36] 杜鹏, 张晓娜, 董诗源. 藻类保健食品研发状况及问题探讨[J]. *海峡预防医学杂志*, 2020, 26(6): 73–75. [DU Peng, ZHANG Xiaona, DONG Shiyuan. Research and development status of algae health food and the existing problems[J]. *Strait Journal of Preventive Medicine*, 2020, 26(6): 73–75.]
- [37] 邢燕, 王敏, 刘玉栋, 等. 固相萃取结合气相色谱-三重四极杆质谱法测定方便面中 16 种多环芳烃[J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(1): 172–176. [XING Yan, WANG Min, LIU Yudong, et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant noodles by solid phase extraction with GC-MS/MS[J]. *Food Research and Development*, 2020, 41(1): 172–176.]
- [38] 王丹红, 吴文晔, 李捷, 等. QuEChERS/高效液相色谱测定食品中 15 种多环芳烃[J]. *中国卫生检验杂志*, 2013, 22(6): 17–20. [WANG Danhong, WU Wenxi, LI Jie, et al. Determination of 15 PAHs in foodstuff by QuEChERS/high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2013, 22(6): 17–20.]