

朱玉姣, 何畅, 唐瑶, 等. 血清中多环芳烃及其衍生物前处理方法优化及应用[J]. 广东工业大学学报, 2025, 42(5): 9-20. doi: 10.12052/gdutxb.250084.
Zhu Yujiao, He Chang, Tang Yao, et al. Optimization and application of a pretreatment method for determining polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in serum[J]. Journal of Guangdong University of Technology, 2025, 42(5): 9-20. doi: 10.12052/gdutxb.250084.

血清中多环芳烃及其衍生物前处理方法优化及应用

朱玉姣^{1,2,3,4}, 何畅^{1,2,3,4}, 唐瑶^{1,2,3,4}, 李桂英^{1,2,3,4}, 安太成^{1,2,3,4}

(1. 广东工业大学 环境健康与污染控制研究院, 广东 广州 510006; 2. 广东工业大学 环境科学与工程学院, 广东 广州 510006; 3. 粤港澳污染物暴露与健康联合实验室, 广东 广州 510006; 4. 广东省环境催化与健康风险控制重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 目前, 已经有充分证据证明母体多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)具有致癌性, 而且关于其甲基化(Methyl PAHs, MPAHs)、杂环(Heterocyclic PAHs, HPAHs)、卤代(Halogenated PAHs, XPAHs)和含氧(Oxygenated PAHs, OPAHs)等衍生物的研究表明, PAHs衍生物的毒性可能比其母体化合物更强。但相关研究多聚焦于环境介质中PAHs及其衍生物的分布特征, 少有研究对人体样本尤其是血清中这类污染物质量浓度进行测定。且目前由于缺乏有效的分析方法, 有关提取血清中这类污染物的前处理方法大多只关注一类或两类PAHs衍生物。为此, 本文以共计68种PAHs及其衍生物(包括PAHs、MPAHs、HPAHs、XPAHs和OPAHs等5种类型的物质)为研究对象, 通过对比不同的液液萃取的提取液、固相萃取柱净化和洗脱液体积对研究目标的回收率, 对前处理方法进行优化。结果表明: 用3 mL乙腈+1 mL乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷混合溶液(20%:40%:40%, 体积分数)进行提取, 用弗罗里硅土固相萃取柱和10 mL二氯甲烷和乙酸乙酯1:1混合溶液进行洗脱净化, 为最优的前处理方案。进一步结合GC-MS/MS分析, 建立了具有高灵敏度、高准确性的血清中68种PAHs及其衍生物的分析方法。该方法的检出限为0.007~1.3 ng/mL, 方法回收率为60%~140%, 准确度为50%~150%。进一步将该方法应用于石化行业工人血清中PAHs及其衍生物的分析, 共测得29种目标物, 包括11种PAHs, 7种MPAHs, 5种HPAHs, 3种XPAHs和3种OPAHs。在测得的物质中质量浓度最高的化合物为2-甲基萘(50 ng/mL), 其次是5-溴萘(36 ng/mL)。该方法适用于人血清中PAHs及其衍生物的检测, 可应用于PAHs及其衍生物对人群健康影响的研究。

关键词: 血清; PAHs及其衍生物; 前处理方法优化

中图分类号: O657.63; O658

文献标志码: A

文章编号: 1007-7162(2025)05-0009-12

Optimization and Application of a Pretreatment Method for Determining Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives in Serum

Zhu Yujiao^{1,2,3,4}, He Chang^{1,2,3,4}, Tang Yao^{1,2,3,4}, Li Guiying^{1,2,3,4}, An Taicheng^{1,2,3,4}

(1. Institute of Environmental Health and Pollution Control, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;
2. School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China;
3. Guangdong-Hong Kong-Macao Joint Laboratory for Contaminants Exposure and Health, Guangzhou 510006, China;
4. Guangdong Key Laboratory of Environmental Catalysis and Health Risk Control, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Currently, there is sufficient evidence of carcinogenicity of parent Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), and their methylated (Methyl PAHs, MPAHs), heterocyclic (Heterocyclic PAHs, HPAHs), halogenated (Halogenated PAHs, XPAHs) and oxygenated (Oxygenated PAHs, OPAHs) derivatives are also proved to be more toxic than their parent compounds. However, most of the studies focus on the distribution characteristics of them in various environmental media, and few studies have measured their levels in human body fluids, especially in serum. Most of the pretreatment methods for extracting PAHs and their derivatives from serum focus only on one

收稿日期: 2025-04-21 录用日期: 2025-05-09 网络首发日期: 2025-07-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2023YFC3905102); 国家自然科学基金资助项目(42407567)

作者简介: 朱玉姣(2002-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为石化行业污染物的健康效应等, E-mail: zyj6174@163.com

通信作者: 安太成(1972-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为新污染物的环境地球化学过程与健康效应, E-mail: antc99@gdut.edu.cn

or two types of PAH derivatives. To fill this gap, this study optimized the pretreatment methods by comparing the recoveries of different liquid-liquid extraction of extracts, solid-phase extraction columns and eluent volumes to detect the total of 68 PAHs and their derivatives (five types of substances including PAHs, MPAHs, HPAHs, XPAHs, and OPAHs). Results showed that the extract was carried out with 3 mL of acetonitrile + 1 mL of ethyl acetate : dichloromethane : n-hexane (20% : 40% : 40%, volume fraction), and cleaned up by elution with a Florisil solid-phase extraction column and 10 mL of a 1 : 1 mixture of dichloromethane and ethyl acetate was combined with GC-MS/MS analysis to establish an analytical method for 68 PAHs and their derivatives in serum with high sensitivity and accuracy. The developed method exhibited a limit of detection ranging from 0.007 to 1.3 ng/mL. The method recovery was between 60% and 140%, with accuracy ranging from 50% to 150%. This method was successfully applied to determine 29 PAHs and their derivatives in the serum of workers in a petrochemical industry. Ultimately, 11 PAHs, 7 MPAHs, 5 HPAHs, 3 XPAHs, and 3 OPAHs were quantified. Among the measured compounds, concentration of 2-methylnaphthalene was the highest (50 ng/mL), followed by 5-bromoanthracene (36 ng/mL). The method is well-suited for analyzing PAHs and their derivatives in human serum and can be effectively utilized to investigate the health impacts of them on humans.

Key words: serum; polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives; pretreatment method optimization

在1979年美国环保署(U.S. Environmental Protection Agency, EPA)就已提出16种优先管控的多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)清单^[1],而我国亦将7种PAHs纳入《中国环境优先污染物黑名单》^[2]。大量研究证明,PAHs可通过皮肤、呼吸、饮食等暴露途径,诱发肺、肝、肠胃等多器官癌症的发生和发展^[3-4]。

值得注意的是,中低环PAHs在环境介质中易转化生成甲基化(Methyl PAHs, MPAHs)、杂环(Heterocyclic PAHs, HPAHs)、卤代(Halogenated PAHs, XPAHs)和含氧(Oxygenated PAHs, OPAHs)等衍生物^[5-7]。尽管衍生物的环境水平通常低于母体PAHs^[8-9],但衍生物官能团的修饰不仅提高其生物膜渗透力与生物可利用性^[10-11],还可通过诱导氧化应激、DAN加合物形成等途径加剧致癌与免疫风险^[12-14]。如对斑马鱼发育的毒性实验显示,占总质量浓度1%~3%的OPAHs的毒性最高,其次是占总质量浓度3%~6%的HPAHs,占总质量浓度91%~97%的PAHs的毒性最低^[10]。

环境暴露风险评价中,传统外暴露评价因环境介质迁移转化过程复杂、个体暴露行为差异大等因素,难以准确反映人体的实际暴露水平,不能得出与疾病发生的明确关系^[15]。相比之下,基于人体生物样品(如血液、尿液)的内暴露评价可直接量化污染物在靶器官的分布,为健康风险评估提供更精确的依据^[15]。血清能直接反映污染物在血液中的实际质量浓度,体现人体的真实内暴露水平,避免传统外暴露模型因时空偏差导致的估计误差^[16]。通过血清中污

染物质量浓度可直接计算致癌风险(如苯并(a)芘当量),或关联代谢组学(如氧化应激标志物)以预测早期健康效应,优于尿液代谢物间接推算^[17],且血清中的脂质成分可富集脂溶性污染物(如PAHs、有机氯农药),其质量浓度较尿液高3个数量级,更适合评估长期累积暴露^[1]。一般来说,职业暴露(如燃煤电厂、石化厂工人)群体的血清污染物质量浓度显著高于普通人群,血清分析可揭示工种、工龄对体内累积的影响^[18]。目前,血清检测结果已应用于修订职业暴露限值、制定污染防控策略(如电子垃圾拆解区禁用特定阻燃剂)^[19]。因此,血清作为内暴露分析材料在准确性、灵敏度与健康风险评估中具有不可替代的优势,广泛应用于环境流行病学与职业卫生研究。

当前PAHs内暴露研究多聚焦于尿液中的羟基代谢产物,但血清作为脂溶性PAHs及其衍生物的主要载体,其分析技术虽有进展,仍面临诸多挑战。血清中PAHs及其衍生物质量浓度低、基质复杂,且不同衍生物化学性质差异大,这些因素增加了检测和定量的难度,也凸显了优化前处理方法和分析条件的必要性。

另外,大多研究较少涉及血清PAHs及其衍生物,原因在于这些物质易在体内代谢,不一定能准确反映人体暴露水平,且一些衍生物(如NPAHs和XPAHs)的环境质量浓度较低。然而,这些代谢产物在某些情况下可作为更直接的生物标志物,反映近期暴露水平尤其对职业暴露人群的健康风险评估意义重大。此外,一些代谢产物可能具有与母体PAHs不同的毒性特征,甚至更具毒性^[12-14]。因此,分析这些

代谢产物有助于更全面地评估PAHs暴露的健康风险。

在石化行业等职业暴露环境中,工人长期暴露于高质量浓度的PAHs及其衍生物中^[20]。通过分析血清中的PAHs及其衍生物,可以识别职业暴露的关键生物标志物,为制定针对性的防护措施提供科学依据。传统研究主要关注母体PAHs的暴露水平,可能低估了衍生物的健康风险。本研究通过同时分析母体PAHs和衍生物,提供了更全面的健康风险评估数据,有助于更准确地识别和评估PAHs及其衍生物对职业暴露人群健康的潜在影响。

综上所述,尽管血清中PAHs及其衍生物的分析存在一定的挑战,但通过优化分析方法和综合考虑代谢产物的生物标志物意义,本文不仅能够更准确地反映人体暴露水平,还能为职业暴露人群的健康风险评估提供更全面的数据支持。这些研究结果将为PAHs及其衍生物的暴露评估和健康风险管理提供重要的科学依据。因此,本文旨在优化分析方法,提高检测灵敏度和准确性,为PAHs及其衍生物的暴露评估提供更可靠的技术支持。构建了液液萃取-固相萃取柱联用技术,系统优化了萃取溶剂体系、吸附柱材质及洗脱参数,实现了血清中19种PAHs及49种衍生物的高效同步提取分析。结合气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)分析,建立了覆盖68种目标物的高灵敏度分析方法。本文的方法突破了多类别PAHs衍生物同步检测的技术壁垒,为精准评价人体污染物暴露提供了关键方法支撑。

1 方法与材料

1.1 试剂

PAHs(19种)、MPAHs(8种)、HPAHs(15种)、XPAHs(22种)和OPAHs(4种)标准样品,同位素内标物(蔡-d8、苊-d10、9-芴酮-d8、菲-d10、葱醌-d8、葱-d12、苊-d12、¹³C-二苯并呋喃和¹³C-咪唑)与替代内标(六甲基苯(HMB)、4-/2-F-Phe、3-F-Chr和9-F-BkFluo),均购自AccuStandard(美国康涅狄格州纽黑文市)。乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷、乙腈、异辛烷(高效液相色谱级),佛罗里硅土固相萃取柱(SPE)(1 g, 6 mL)、C18固相萃取柱(1 g, 6 mL)、PTFE防交叉污染导向管均购于中国上海安谱实验科技股份有限公司。

使用的仪器主要有三重四极杆气相色谱(GC-2010 Plus, 日本岛津)质谱联用仪(TQ8040, 日本岛津)。

1.2 血清前处理方法建立

为实现血清中的痕量PAHs及其衍生物的高效分析,不仅需要建立目标物的高回收率萃取方法,也要有效去除复杂基质干扰物(蛋白质、脂肪等)。基于此,本文首先比较了不同极性溶剂对目标化合物的提取效率,随后对比了佛罗里硅土与C18固相萃取柱对PAHs及其衍生物的净化效率,最终建立血清中母体PAHs及其4类衍生物的高回收率、高选择性的前处理方法。

具体方案如图1所示。取0.5 mL血清置于50 mL特氟龙离心管中,加入20 μ L内标混合物(200 ng/mL),随后加入提取液(不同比例的乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷与正己烷)。混合物经过混匀后,利用超声提取(10 min),离心(4 000 r/min)10 min,收集上清液。重复液液萃取3次以提高目标物的回收率,合并上清液经旋转蒸发浓缩至1 mL。随后,利用固相萃取柱净化样品。洗脱液经旋蒸浓缩至近干后,以异辛烷置换溶剂至40 μ L,转移至进样瓶中待测。

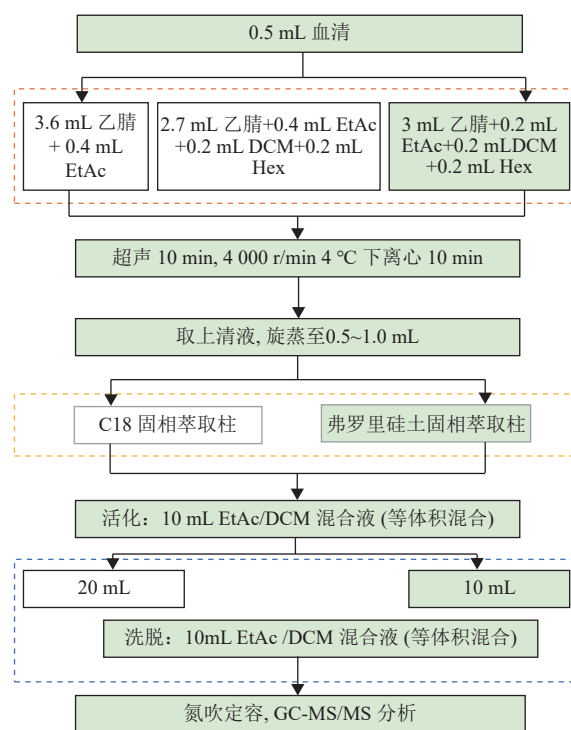


图1 前处理方法优化流程

Fig.1 Optimization process for pre-processing methods

1.2.1 液液萃取溶剂优化

血清基质中蛋白/脂质干扰物与PAHs衍生物极性差异显著,传统单一溶剂体系难以兼顾多类别目标物的同步提取。本文提出“极性梯度萃取”策略:通过乙腈(强极性)沉淀蛋白和脂质后,引入弱极性的乙酸乙酯、二氯甲烷、正己烷混合溶剂(20% : 40% :

40%, 体积分数)拓宽极性覆盖范围。为验证该策略, 对比3种溶剂组合: ① 3.6 mL乙腈、0.4 mL乙酸乙酯; ② 2.7 mL乙腈、0.4 mL乙酸乙酯、0.2 mL二氯甲烷和0.2 mL正己烷; ③ 3 mL乙腈、0.2 mL乙酸乙酯、0.2 mL二氯甲烷、0.2 mL正己烷。经净化浓缩后, 测定各目标物在GC-MS/MS中的峰面积响应, 对比标准样品, 计算各目标物的回收率。

1.2.2 固相萃取柱筛选

针对血清中PAHs及其衍生物痕量富集与基质净化的需求, 本文系统评估了弗罗里硅土与C18固相萃取柱对5类目标化合物的净化与富集效率。具体来说, 将含有10 ng目标化合物的正己烷溶液转移至活化后的SPE柱(活化条件, 10 mL二氯甲烷、乙酸乙酯混合溶液等体积混合), 随后弗罗里硅土固相萃取柱以同比例洗脱液10 mL洗脱目标物, 而C18固相萃取柱用10 mL的超纯水淋洗后, 再以10 mL二氯甲烷、乙酸乙酯等体积混合的溶液进行洗脱。洗脱液经氮气浓缩至近干后, 以异辛烷置换溶剂并定容至40 μ L, 经GC-MS/MS(TQ8040, 日本岛津)分析获得各化合

物中的峰面积响应。对比标准样品, 计算各目标物的回收率。

1.2.3 洗脱条件的优化

洗脱体积是SPE净化效率的关键参数, 直接影响目标化合物的回收率与溶剂消耗量。实验对比10 mL与20 mL洗脱液(二氯甲烷、乙酸乙酯混合溶液(等体积混合))对68种目标物的洗脱效率。经浓缩后, 分析各化合物的仪器峰面积响应, 对比标准样品, 计算各目标物的回收率。

1.3 气相色谱-质谱条件

色谱分离采用DB-5MS毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m), 升温程序为: 初温80 $^{\circ}$ C(保持0.5 min); 5 $^{\circ}$ C/min升至280 $^{\circ}$ C, 15 $^{\circ}$ C/min升至300 $^{\circ}$ C(保持3 min), 20 $^{\circ}$ C/min升至315 $^{\circ}$ C, 随后升至320 $^{\circ}$ C(保持3 min)。载气采用高纯氦气, 柱流速为1.0 mL/min, 进样口温度为280 $^{\circ}$ C, 进样量2 μ L, 采用不分流进样模式。每种分析物定性和定量分析的多重反应监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)参数详见表1。

表1 68种PAHs及其衍生物的检出限

Table 1 Detection limits of 68 PAHs and their derivatives

物质类型	物质名称	缩写	MRM(m/z)	保留时间/min	ISTD	仪器检出限/(ng \cdot mL $^{-1}$)	方法检出限/(ng \cdot mL $^{-1}$)
PAHs	萘	Nap	128.00>102.10	7.49	8	0.28	2.13
	蒽	Ace	153.00>152.10	14.718	1	0.048	0.5
	芴	Fle/Flu	166.00>165.10	17.12	1	0.02	0.93
	菲	Phe	178.00>152.10	21.549	11	0.27	0.96
	蒽	Ant	178.00>152.10	21.791	1	0.022	0.17
	荧蒽	Flut	202.00>200.10	27.176	1	0.72	0.86
	芘	Pyr	202.00>201.10	28.173	1	0.74	0.94
	苯并[c]菲	B[c]p	228.00>227.10	32.937	1	0.75	0.79
	苯并[a]蒽	B[a]a	228.00>226.00	33.956	1	0.19	0.29
	屈	Chr	228.00>226.10	34.108	13	0.007	0.08
	苯并[b]荧蒽	BbF	252.00>250.00	38.725	1	0.9	0.94
	苯并[j]荧蒽	BjF	252.00>250.10	38.817	1	0.94	0.99
	苯并[k]荧蒽	BkF	252.00>250.10	38.817	1	0.94	0.99
	苯并[e]芘	BeP	252.00>250.10	39.816	1	0.60	0.63
	苯并[a]芘	BaP	252.00>250.10	40.016	1	0.85	0.87
	二苯并[a,h]蒽	Db[a,h]ant	276.00>274.00	43.776 0	1	0.72	0.73
茚并[1,2,3-cd]芘	In[1,2,3-cd]p	276.00>274.10	43.658 0	1	0.71	0.73	
苯并[ghi]花	B[ghi]p	276.00>274.00	44.510 0	1	0.85	0.86	
萘烯	Any	152.00>151.20	13.925	1	0.20	0.26	
MPAHs	2,7-二甲基萘	2,7-DMNap	156.00>141.00	12.899	1	0.93	5.50
	1,3-二甲基萘	1,3-DMNap	156.00>141.00	13.195	1	0.86	7.02
	1,4-二甲基萘	1,4-DMNap	156.00>141.00	13.658	1	0.03	1.14
	1,6,7-三甲基萘	1,6,7-TMNap	170.00>155.00	16.618	1	0.02	3.12
	1,4,6,7-四甲基萘	1,4,6,7-TMNap	184.00>168.90	19.381	1	0.016	1.82
	7,12-二甲基苯并[a]蒽	7,12-DMb[a]ant	256.00>241.10	38.726	1	0.084	0.11

续表

物质类型	物质名称	缩写	MRM(<i>m/z</i>)	保留时间/min	ISTD	仪器检出限/(ng·mL ⁻¹)	方法检出限/(ng·mL ⁻¹)	
MPAHs	3-甲基胆蒽	3-Mcholant	268.00>252.10	41.401 0	1	0.71	0.75	
	2-甲基萘	2-MNap	142.00>141.10	10.155	1	0.14	2.73	
HPAHs	喹啉	QL	129.00>102.10	8.919	3	0.49	0.67	
	吲哚	Indole	117.00>90.00	10.064	3	0.64	1.58	
	4-甲基二苯并呋喃	4-MDBF	182.00>181.10	17.958	2	0.06	1.60	
	二苯并噻吩	DBT	184.00>152.10	20.939	3	0.24	0.36	
	4-甲基二苯并噻吩	4-MDBT	198.00>197.00	23.053	3	0.53	1.6	
	5,6-苯并喹啉	5,6-BQL	179.00>178.10	22.801	3	0.45	0.6	
	3-甲基二苯并噻吩	3-MDBT	198.00>196.90	23.491	3	0.04	0.05	
	咔唑	CBZ	167.00>166.10	22.855	3	0.23	0.3	
	4,6-二甲基二苯并噻吩	4,6-DMDBT	212.00>211.10	25.1	3	0.07	3.12	
	1,8-二甲基咔唑	1,8-DMCBZ	195.00>194.20	25.399	3	0.52	0.52	
	3-甲基咔唑	3-MCBZ	181.00>180.10	25.03	3	0.68	0.68	
	2,8-二甲基二苯并噻吩	2,8-DMDBT	212.00>211.20	25.798	3	1.3	1.3	
	1,4-二甲基咔唑	1,4-DMCBZ	195.00>194.20	26.68	3	0.13	0.13	
	2-二苯并噻吩	2-NDBT	229.00>182.70	30.384	1	0.29	0.29	
	7-甲基苯并[b]萘并[2,3-d]噻吩	7-MB[b]nap[2,3-d]T	248.00>247.10	35.784	1	0.03	0.07	
	XPAHs	9-氯蒽	9-Cl-Fle	165.00>164.10	17.121	5	0.069	0.66
		2-溴蒽	2-Br-Fle	165.00>164.00	24.144	5	0.17	0.17
9-/2-氯菲		9-/2-Cl-Phe	212.00>176.10	25.788	6	0.55	0.55	
1-/2-氯蒽		1-/2-Cl-Ant	212.00>176.40	25.987	6	0.4	0.40	
1,2-二溴蒽		1,2-Br2-Any	310.00>309.50	26.376	5	0.035	0.33	
2,7-二氯蒽		2,7-Cl2-Fle	199.00>163.20	26.433	5	0.09	0.09	
3-溴菲		3-Br-Phe	256.00>176.10	27.728	6	1.2	1.2	
9-溴蒽		9-Br-Ant	258.00>177.30	28.21	6	0.74	0.74	
1,5-二氯蒽		1,5-Cl2-Ant	246.00>176.10	29.613	6	0.49	0.49	
9,10-二氯蒽		9,10-Cl2-Ant	246.00>176.30	29.615	6	0.43	0.43	
9,10-二氯菲		9,10-Cl2-Phe	246.00>176.30	29.884	6	0.78	0.78	
2,7-二溴蒽		2,7-Br2-Fle	243.00>163.10	30.61	5	0.09	0.09	
3-溴菲		3-Br-Fle	282.00>201.10	33.018	5	0.66	0.66	
9,10-二溴蒽		9,10-Br2-Ant	336.00>176.20	33.641	6	0.66	0.66	
4-溴芘		4-Br-Pyr	201.00>200.00	33.765	7	0.22	0.22	
9,10-二溴菲		9,10-Br2-Phe	336.00>176.20	33.967	6	0.087	0.087	
1-溴芘		1-Br-Pyr	280.00>201.10	34.052	7	0.021	0.02	
1,5,9,10-四氯蒽	1,5,9,10-Cl4-Ant	316.00>244.10	37.393	6	0.69	0.69		
1,6-二溴芘	1,6-Br2-Pyr	200.00>199.30	39.341	7	0.12	0.13		
7-溴苯并[a]蒽	7-Br-BaA	306.00>226.00	39.354	5	0.037	0.037		
OPAHs	9-芴酮	9-Fluo	180.00>152.20	20.589	10	0.037	0.27	
	蒽醌	AntQ	208.00>151.80	25.459	12	0.65	1.2	
	苯并蒽酮	Benzanthrone	230.00>201.00	34.68	1	0.85	0.85	
	二苯并呋喃	DBF	168.00>139.10	15.46	2	0.72	1.9	
内标	芘-d12	Pyr-D12	264.00>260.20	40.252 0	1			
	萘-d8	Nap-d8	136.00>108.10	7.42	ISTD8			
	芘-d10	Ace-d10	164.00>162.20	14.577	ISTD9			
	9-芴酮-d8	9-Flut-d8	188.00>160.10	20.505	ISTD10			
	菲-d10	Phe-d10	188.00>160.10	21.438	ISTD11			
	蒽醌-d8	AntQ-d8	216.00>188.10	24.861	ISTD12			
¹³ C-二苯并呋喃	¹³ C-DBF	180.00>150.10	15.48	ISTD2				

续表

物质类型	物质名称	缩写	MRM(<i>m/z</i>)	保留时间/min	ISTD	仪器检出限/(ng·mL ⁻¹)	方法检出限/(ng·mL ⁻¹)
内标	¹³ C-咔唑	13C-Carbazole	175.00>173.10	22.774	ISTD3		
	六甲基苯	HMB	162.00>147.10	13.859	ISTD1		
	4-/2-氟菲	4-/2-F-Phe	196.00>195.10	21.01	ISTD6		
	3-氟屈	3-F-Chr	246.00>244.00	33.572	ISTD7		
	9-氟苯并[k]荧蒽	9-F-BkFluo	270.00>268.30	37.809	ISTD5		
	屈-d12	Chr-d12	240.00>236.00	33.658	ISTD13		

1.4 质量控制

每组实验设置平行组,每10个样品中设置一个基质空白和空白加标样品。空白样品是以胎牛血清为基质,加入20 μL的内标物(Internal Standard, ISTD)混合液(200 ng/mL)后进行前处理。以胎牛血清为基质,加入20 μL的内标混合液(200 ng/mL)后,加入8 μL目标物标准混合液(100 ng/mL)做成基质加标样品。

回收率计算采用外标法,某目标物扣除空白样品的峰面积之后的基质加标样品的峰面积与标准品的峰面积的比值即为该目标物的回收率。分别取适量PAHs和衍生物标准储备溶液,用异辛烷稀释定容制成质量浓度分别为400、200、100、50、20、10、5、2 ng/mL的标准系列溶液,内标质量浓度均为100 ng/mL,按照第1.3节的方法进行测定,以目标分析物的定量离子对峰面积和对应同位素内标定量离子对峰面积的比值为纵坐标,以其质量浓度的比值为横坐标,绘制标准曲线。结果显示,68种PAHs及其衍生物在2~400 μg/L范围内线性关系良好,相关系数(R^2)均大于0.995。

根据目标物与内标的结果和环数的不同来确定每一个目标物所对应的内标。将基质加标样品用标曲定量得到的质量浓度减去空白样品定量的质量浓度之后与加标质量浓度之比即为准确度。根据美国食品药品监督管理局发布的程序文件^[21],本研究采用3倍信噪比(S/N=3)来估算仪器的检出限,并通过空白样品中物质浓度的平均值与空白值3倍相对标准偏差之和来预估方法的检出限。

1.5 样品采集

于2022年9月至10月采集了典型石化工厂工人和对照区居民的血清样本。该石化行业工业基地2022年的石油产量排名在中国前30位,当量产量超过120万 t。对照人群为距离石化行业厂区周围约80 km的居民。在参与之前,已经告知志愿者们这项研究的目的,并请他们填写了一份基本的问卷。本研究经广东工业大学伦理委员会批准。由专业护士为

每位志愿者采集空腹外周血,共收集到约2 000份血液样本,血样4 000 r/min离心5 min,将上部血清转移到干净的试管中,获得血清样品。并立即采品保存于-80 °C冰箱,直至分析。

2 结果与讨论

2.1 血清前处理方法建立

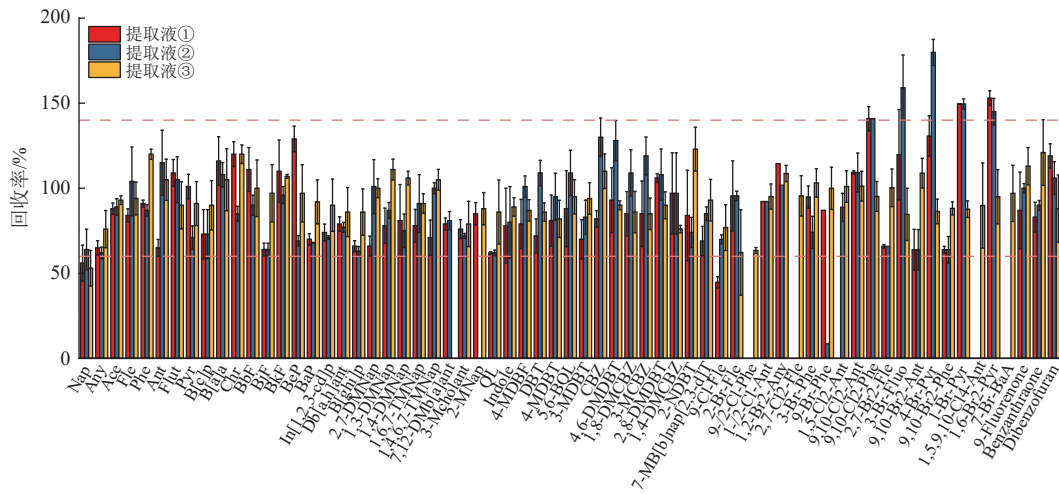
2.1.1 液液萃取溶剂优化

共68种PAHs及其衍生物的回收率如图2(a)所示,各目标物的整体回收率在60%~140%之间,3种萃取溶剂之间出现了显著差异。

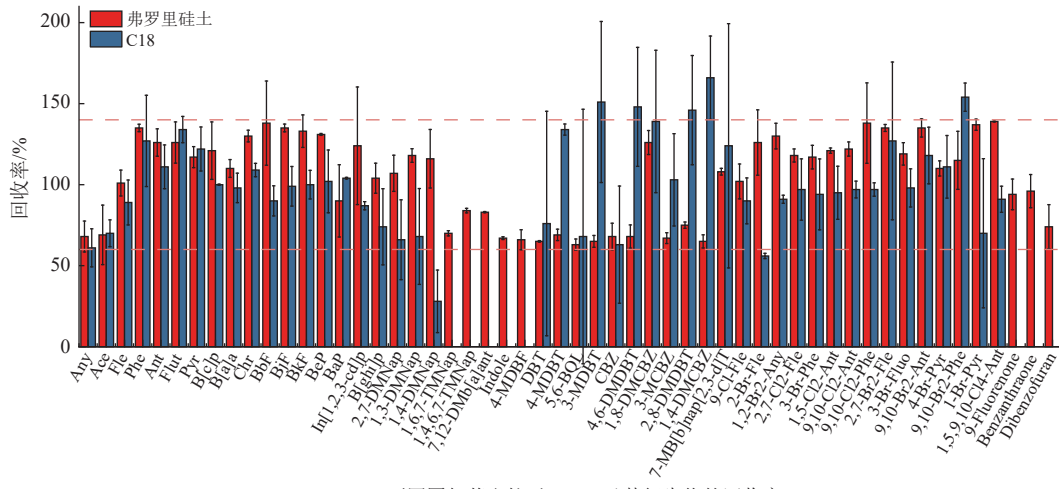
提取液①(3.6 mL乙腈+0.4 mL乙酸乙酯)中,有一半的XPAHs的回收率低于20%。这表明乙腈、乙酸乙酯(90%:10%,体积分数)的混合溶液对XPAHs的提取能力有限,无法充分溶解并分离出目标化合物,尤其是在处理复杂基质的血清样本时。这种低回收率可能是由于乙腈的极性较高,虽然能够提取部分目标化合物,但对于一些疏水性较强的XPAHs,其溶解能力不足,导致提取不完全。

提取液②(2.7 mL乙腈、0.4 mL乙酸乙酯、0.2 mL二氯甲烷和0.2 mL正己烷的混合溶液)中,1-溴苣、4-溴苣和1,6-二溴苣的回收率远高于140%,而对于9,10-二溴苣的回收率则远低于20%。这种极端的回收率差异表明,提取液②中非极性溶剂比例不足导致相分配失衡,在提取过程中存在明显的非特异性吸附或损失问题。过高的回收率可能是因为部分目标化合物在提取过程中发生了富集或二次吸附,而低回收率则可能是由于某些化合物在提取过程中未能被有效溶解或被其他成分干扰,导致提取效率低下。

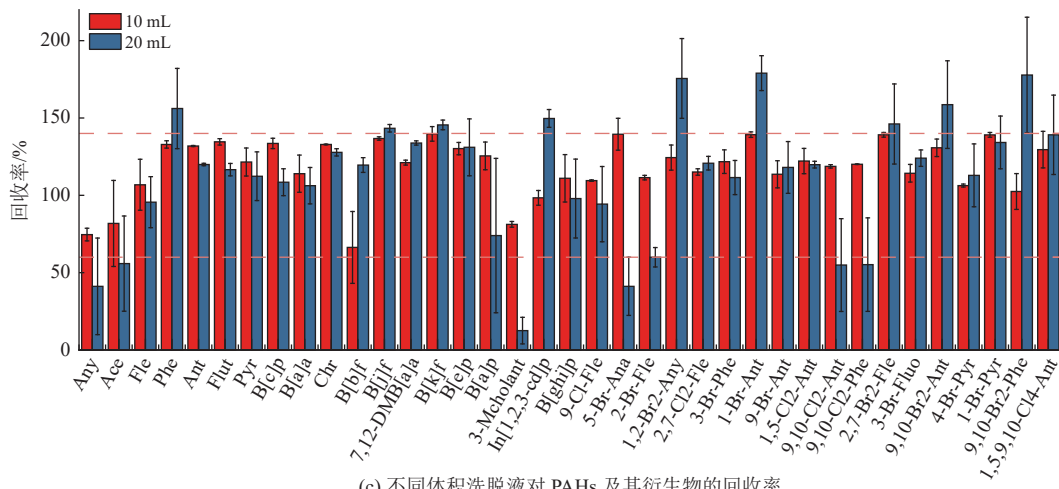
提取液③(3 mL乙腈、0.2 mL乙酸乙酯、0.2 mL二氯甲烷、0.2 mL正己烷)中,所有PAHs及其衍生物的回收率均在60%~140%的范围内,说明通过极性梯度调控,实现了5类目标物回收率的全覆盖。这种优化的提取液组合通过合理搭配极性和非极性溶剂,有效提高了对各类PAHs的提取能力,同时减少了杂质的干扰,确保了提取过程的可靠性和重复性。



(a) 不同提取液对 PAHs 及其衍生物的回收率



(b) 不同固相萃取柱对 PAHs 及其衍生物的回收率



(c) 不同体积洗脱液对 PAHs 及其衍生物的回收率

图 2 质控相关图

Fig.2 QC correlation plots

综合以上实验结果, 提取液③因其广谱的提取效率被确立为血清中多环芳烃及其衍生物提取的最佳溶剂。

2.1.2 固相萃取柱筛选

固相萃取柱筛选实验结果如图2(b)所示, C18固

相萃取柱对宽极性范围PAHs及其衍生物的选择性吸附能力不足。对PAHs和XPAHs有较好的提取效果, 但是对于MPAHs、HPAHs和OPAHs提取效果很差。对1,4-二甲基萘, 1,4,6,7-四甲基萘和9-蒽酮、蒽醌的回收率甚至低于20%。而对咔唑、4,6-二甲基咔唑、

1,4-二甲基吡啶和2,8-二甲基二苯并噻吩等的回收率高于140%。C18柱的工作原理是基于疏水相互作用,适用于非极性和中等极性化合物的吸附,而不同取代基的PAHs衍生物因其极性和分子结构的差异,可能表现出显著的保留行为分化。疏水性增强可能导致其在C18柱上的保留过强,进而使其回收率较低,若洗脱条件过强,也可能因竞争洗脱导致其他低极性PAHs被过度洗脱,回收率异常升高。同时在超纯水淋洗步骤(极性极高)中,MPAHs可能因保留不足而部分流失,从而回收率较低。总体而言,这些化合物的回收率可能过高或过低,这表明C18柱在处理这些特定化合物时存在明显的吸附或洗脱问题。

相比而言,佛罗里硅土固相萃取柱对PAHs及其衍生物的回收率均在60%~140%的范围内。表明佛罗里硅土SPE柱通过正相吸附机制实现广谱净化,其主要成分硅藻土具有较大的比表面积和丰富的活性位点,能够有效吸附多种有机化合物。该柱在处理目标化合物时表现出良好的平衡性,能够有效去除杂质,同时确保目标化合物的回收率处于合理区间。这种稳定的回收率范围意味着佛罗里硅土柱在不同化合物之间具有较为一致的吸附和洗脱行为,减少了因吸附剂选择性而导致的偏差。

上述实验结果表明,佛罗里硅土SPE柱可以实现复杂基质中多种PAHs及其衍生物的选择性净化与高效回收,因此本文选择佛罗里硅土柱作为前处理方法。

2.1.3 洗脱液条件的优化

洗脱液条件优化实验发现,使用10 mL洗脱液时,所有目标化合物的回收率均在60%~140%之间(见图2(c))。表明10 mL的洗脱液在去除杂质的同时,也能够有效地洗脱目标化合物,避免了因洗脱液过多而导致的实验误差。

但是,增大洗脱液体积至20 mL时,有9种目标化合物(如菲、1,2-二溴萘等)的回收率异常升高(>140%),6种目标化合物(如萘、3-甲基胆蒎等)的回收率则低于60%。这种回收率的差异性表现表明,增加洗脱液的体积,并不能明显改善方法对于目标物的回收率,反而会使目标物的回收率变差。此外,较小的洗脱液体积可以减少溶剂的使用量,减少萃取时间,提高萃取效率。基于上述实验结果和分析,本文选择10 mL二氯甲烷、乙酸乙酯混合溶液(等体积混合)作为洗脱液。

2.2 方法验证

2.2.1 回收率

利用基质加标样品,经优化前处理流程后,采

用GC-MS/MS检测目标物的峰面积,基于外标法计算得到68种PAHs及其衍生物的回收率,结果如图3所示。发现多数目标化合物的回收率处于60%~140%范围内(相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD) = 1.1%~25%),符合美国食品药品监督管理局发布的程序文件中对痕量有机污染物分析的质控要求^[21]。值得注意的是,萘(53%)和1/2-氯蒎(30%)的回收率较低。这种现象可能是由于萘具有较低的沸点,容易在浓缩阶段挥发损失。而对于1/2-氯蒎的低回收率,可能是由于前处理过程中的提取不充分导致的。

2.2.2 精确度与准确性

采用内标法对方法精确性与准确度进行定量校正,通过匹配目标物与内标物(见表1)的化学结构相似性与保留时间窗口,以峰面积比值为依据构建标准曲线($R^2 > 0.995$)。经内标校正后,68种PAHs及其衍生物的定量准确度在50%~150%之间(见图4)。这一结果符合HJ/T-2002对痕量有机污染物的准确度要求。

同时,为了进一步验证前处理方法的精确性(以RSD表示),在不同批次样品中分别分析了3个基质加标样品,经过定量分析发现各目标物的RSD范围为1%~25%,说明本文建立的方法可靠。

2.2.3 方法检出限

有29种PAHs及其衍生物在空白样品中被检出,包括11种PAHs、7种MPAHs、5种HPAHs、3种XPAHs和3种OPAHs。其中,2-甲基萘(2-MNap)在空白样品中的质量浓度最高,达到了0.62 $\mu\text{g/mL}$,说明这些化合物可能在实验环境中存在一定的背景干扰。低分子量PAHs(如萘)因高蒸气压更易通过实验室环境污染样品,在空白样品中普遍检出。

各目标物的仪器检出限范围为0.007~1.3 ng/mL ,方法检出限为0.02~7.02 ng/mL (见表1),说明了该方法对不同的化合物具有不同的灵敏度。2,8-二甲基二苯并噻吩的仪器检出限最高,达到1.3 ng/mL 。这表明该化合物在分析过程中可能受到较大的背景干扰,或较弱的仪器响应。而屈的检测限最低,仅为0.007 ng/mL 。1-溴萘的方法检出限最低为0.02 ng/mL ,1,3-二甲基萘的检出限最高为7.02 ng/mL 。方法检出限越高,说明空白值中该物质的含量越高,对后续测定可能会产生影响,而低检测限的化合物通常在环境和生物样品中具有重要的指示作用,因为它们能够在极低质量浓度下被检测到,从而为早期污染预警和健康风险评估提供了有力支持。

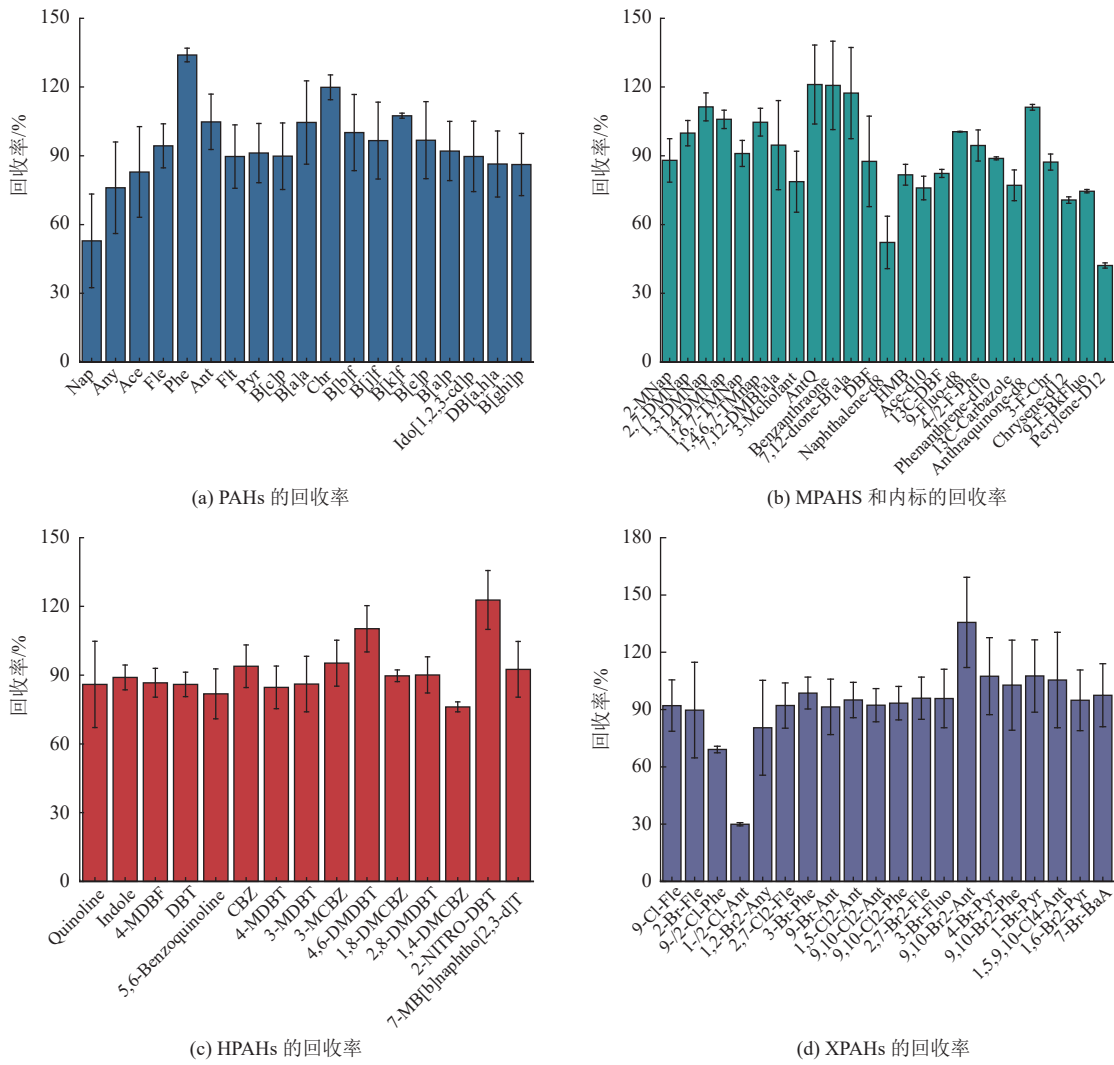
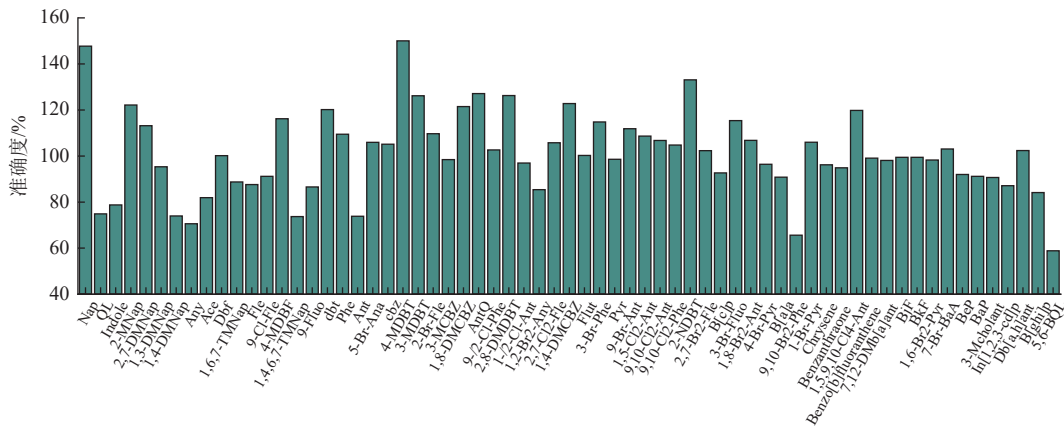


图 3 PAHs及其衍生物的回收率
 Fig.3 Recoveries of PAHs and their derivatives



2.3 方法应用

利用优化后的前处理方法,本文对28个典型石化工厂工人的血清样本进行了系统分析。这28名工

人中有20名男性,8名女性,平均年龄为45岁。共检出29种PAHs及其衍生物,其中包括11种PAHs、7种MPAHs、5种HPAHs、3种XPAHs和3种OPAHs。

检测到的化合物的检出率和中位数质量浓度如表2所示。在28个样品中,萘的检出率最高,且在每一个样品中均有检出;质量浓度最高的化合物是2-甲基萘(50 ng/mL),其次是5-溴萘(36 ng/mL)。这3种化合物均属于低分子量PAHs,仅含有3个以内的芳香环。它们的高质量浓度和高检出率表明在石化场地工人的血清中,这些低分子量PAHs的质量浓度相对较高。这一现象在先前的研究中也观察到^[22-23]。

这种现象可能与低分子量多环芳烃(PAHs)的物理化学性质密切相关。低分子量PAHs通常具有较高的挥发性和溶解性,这使得它们更容易在血清中富集并被检测到。相比之下,高分子量PAHs由于其较大的分子结构,溶解性较差,且在生物体内的代谢和排泄过程更为复杂,导致其在血清中的质量浓度相

对较低。具体而言,石化场地工人可能主要通过吸入或皮肤接触暴露于低分子量PAHs,这些化合物能够更快地进入血液循环并被检测到。而高分子量PAHs由于其较低的挥发性,暴露途径可能更为有限,因此在血清中的质量浓度较低。

而对于5种类型的多环芳烃及其衍生物,MPAHs的总质量浓度最高,XPAHs的质量浓度次之。而OPAHs的质量浓度最低。各种类型多环芳烃及其衍生物的总质量浓度水平,与检出的物质种类有关系,OPAHs检出种类较少,故其质量浓度最低,而且石化厂以高温裂解为主,直接产生的OPAHs较少。而MPAHs质量浓度最高,主要是因为MPAHs是石油加工过程的特征污染物。研究表明,原油或苯类产品的加工(如苯洗涤工艺)会释放大量甲基化衍生物,例

表2 血清样品中PAHs及衍生物的检出率和质量浓度
Table 2 Detection rate and concentration of PAHs and their derivatives in serum samples

物质及求和项	检出率/%	中位数质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	范围/(ng·mL ⁻¹)
萘	100	16	0.22~170
芴烯	54	0.47	0.13~15
芴	32	0.25	0.25~16
芴	29	0.46	0.46~9.5
菲	57	0.99	0.48~36
蒽	86	3.4	0.09~14
荧蒽	36	0.26	0.43~1.2
芘	50	0.63	0.47~20
苯并[c]菲	11	0.4	0.4~1.9
苯并[a]蒽	25	0.14	0.14~0.4
屈	57	0.14	0.042~8.7
\sum_{11} PAHs		23	
2-甲基-萘	89	50	1.4~260
2,7-二甲基-萘	82	15	2.7~120
1,3-二甲基萘	75	18	3.5~210
1,4-二甲基萘	68	1.8	0.57~28
1,6,7-三甲基萘	29	1.5	1.5~40
1,4,6,7-四甲基萘	21	0.91	0.91~32
1-甲基-9H-芴	25	0.6	0.6~190
\sum_7 MPAHs		88	
喹啉	86	3.7	0.33~51
吲哚	82	8.3	0.75~59
4-甲基二苯并呋喃	57	1.7	0.8~73
二苯并噻吩	50	0.2	0.18~7.3
三甲基二苯并噻吩	43	0.025	0.025~2.9
\sum_5 HPAHs		14	
9-氯芴	89	3.3	0.7~37
5-溴萘	86	36	0.25~120
1,2-二溴芴烯	11	0.17	0.17~1.9
\sum_3 XPAHs		39	
9-芴酮	43	0.14	0.14~19
蒽醌	61	1.5	0.6~15
二苯并呋喃	39	0.95	0.95~20
\sum_3 OPAHs		2.6	
\sum_{29} All		167	

如二甲萘等^[24]。而XPAHs可能源自如石油冶炼中的催化剂使用或设备腐蚀等高温燃烧或化工合成中的卤素掺杂过程。

3 结论

根据研究目的,本文首先对前处理的提取液进行优化:通过对比3种提取液,发现提取液③(3 mL乙腈+1 mL乙酸乙酯、二氯甲烷和正己烷混合溶液,体积分数比为1:2:2)对PAHs及其衍生物的提取效果最佳。接着,对固相萃取柱及洗脱液进行选择,结果表明弗罗里硅土固相萃取柱和10 mL二氯甲烷与乙酸乙酯(体积分数比为1:1)混合溶液是最佳的洗脱液组合。建立完善的前处理方法之后,对方法的检出限、回收率等指标进行验证,检出限0.007~1.3 ng/mL,回收率60%~140%,准确度50%~150%。将该方法应用于石化行业工人血清检测,成功测得29种PAHs及其衍生物,包括11种PAHs、7种MPAHs、5种HPAHs、3种XPAHs和3种OPAHs。通过上述步骤建立了一种高灵敏度、高准确性的分析方法,可同时检测血清中的19种PAHs及49种衍生物。该方法适用于人血清中PAHs及其衍生物的检测,可用于研究PAHs及其衍生物对人群健康的影响。

参考文献:

- [1] SANTOS P M, DEL NOGAL SÁNCHEZ M, PAVÓN J L P, *et al.* Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in human biological samples: a critical review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 113: 194-209.
- [2] 卢楠. 煤矿区多环芳烃扩散途径、分布机制研究进展[J]. *环境保护前沿*, 2020, 10(4): 516-520.
LU N. Study on diffusion path, distribution mechanism and biodegradation of PAHs in coal mine area[J]. *Advances in Environmental Protection*, 2020, 10(4): 516-520.
- [3] RAJPARA R K, DUDHAGARA D R, BHATT J K, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at the Gulf of Kutch, Gujarat, India: occurrence, source apportionment, and toxicity of PAHs as an emerging issue[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 119(2): 231-238.
- [4] YU H. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2002, 20(2): 149-183.
- [5] 陈雪, 许丹丹, 钱雅慧, 等. 淮北矿区煤矸石多环芳烃污染特征及毒性评价[J]. *中国环境科学*, 2022, 42(2): 753-760.
CHEN X, XU D D, QIAN Y H, *et al.* Pollution characteristics and toxicity assessment of PAHs in coal gangue from mine area in HuaiBei[J]. *China Environmental Science*, 2022, 42(2): 753-760.
- [6] 吕元飞, 宝剑锋, 张凌博, 等. 某石化厂土壤多环芳烃污染特征及健康风险评估研究[J]. *环境科学与管理*, 2022, 47(2): 169-174.
LYU Y F, BAO J F, ZHANG L B, *et al.* Pollution characteristics and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons of a petrochemical plant[J]. *Environmental Science and Management*, 2022, 47(2): 169-174.
- [7] JIN R, ZHENG M, LAMMEL G, *et al.* Chlorinated and brominated polycyclic aromatic hydrocarbons: sources, formation mechanisms, and occurrence in the environment [J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2020, 76: 100803.
- [8] FORSBERG N D, WILSON G R, ANDERSON K A. Determination of parent and substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in high-fat salmon using a modified QuEChERS extraction, dispersive SPE and GC-MS[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(15): 8108-8116.
- [9] QIAO M, QI W, LIU H, *et al.* Oxygenated, nitrated, methyl and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers of Haihe River System, China: occurrence, possible formation, and source and fate in a water-shortage area[J]. *Science of The Total Environment*, 2014, 481: 178-185.
- [10] TITALEY I A, CHLEBOWSKI A, TRUONG L, *et al.* Identification and toxicological evaluation of unsubstituted PAHs and novel PAH derivatives in pavement sealcoat products[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2016, 3(6): 234-242.
- [11] WANG W, JARIYASOPIT N, SCHRLAU J, *et al.* Concentration and photochemistry of PAHs, NPAHs, and OPAHs and toxicity of PM2.5 during the Beijing Olympic Games[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(16): 6887-6895.
- [12] JIN R, LIU G, ZHOU X, *et al.* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in environment[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 160: 116942.
- [13] PENG B, DONG Q, LI F, *et al.* A systematic review of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives: occurrences, levels, biotransformation, exposure biomarkers, and toxicity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(41): 15314-15335.
- [14] WINCENT E, JÖNSSON M E, BOTTAI M, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor activation and developmental toxicity in zebrafish in response to soil extracts containing unsubstituted and oxygenated PAHs[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(6): 3869-3877.
- [15] 支梦雪, 王建设. 暴露组学在识别环境污染物及其健康危害中的应用进展[J]. *色谱*, 2024, 42(2): 142-149.
ZHI M X, WANG J S. Advances in the applications of exposomics in the identification of environmental pollutants and

- their health hazards[J]. *Se Pu*, 2024, 42(2): 142-149.
- [16] DAI K, WANG C, YAO W, *et al.* Expression level and function analysis of serum miRNAs in workers with occupational exposure to benzene series[J]. *Chemosphere*, 2023, 313: 137460.
- [17] EKPE O D, SIM W, CHOI S, *et al.* Assessment of exposure of Korean firefighters to polybrominated diphenyl ethers and polycyclic aromatic hydrocarbons via their measurement in serum and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(20): 14015-14025.
- [18] ZHAO C, LI C, WANG C, *et al.* Ultrasensitive determination of 39 parent and emerging halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons in human serum[J]. *Analytical Methods*, 2022, 14(14): 1430-1438.
- [19] GOÑI F, LÓPEZ R, ETXEANDIA A, *et al.* Method for the determination of selected organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum based on a gel permeation chromatographic clean-up[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(11): 1533-1539.
- [20] REHWAGEN M, MÜLLER A, MASSOLO L, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas[J]. *Science of The Total Environment*, 2005, 348(1-3): 199-210.
- [21] US FDA. Bioanalytical method validation guidance for industry[R]. U. S. : Food and Drug Administration (FDA or Agency) , 2018.
- [22] KOUKOULAKIS K G, KANELLOPOULOS P G, CHRYSOCHOU E, *et al.* Leukemia and PAHs levels in human blood serum: preliminary results from an adult cohort in Greece[J]. *Atmospheric Pollution Research*, 2020, 11(9): 1552-1565.
- [23] WANG B, JIN L, REN A, *et al.* Levels of Polycyclic aromatic hydrocarbons in maternal serum and risk of neural tube defects in offspring[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(1): 588-596.
- [24] ZHANG S, LI H, HE R, *et al.* Spatial distribution, source identification, and human health risk assessment of PAHs and their derivatives in soils nearby the coke plants[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 861: 160588.
- (责任编辑: 杨耀辉 英文审核: 熊荣斌)