

# 固相萃取/高效液相色谱荧光法测定 草珊瑚中苯并[α]芘残留

林 埔, 梁一池, 胡 娟\*

(福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122)

**摘 要:** 采用固相萃取方法, 建立了草珊瑚中苯并[α]芘的高效液相色谱荧光测定方法。以正己烷为提取溶剂对草珊瑚样品进行提取, 经中性氧化铝固相萃取柱净化样品后, 用高效液相色谱荧光检测器检测, 荧光检测器激发波长为 370 nm, 发射波长为 425 nm, 流动相为乙腈-水(85:15), 流速为 1.0 mL/min。结果表明: 苯并[α]芘在 0~20 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数( $r$ )为 0.999 9, 定量下限为 0.36 μg/kg, 回收率为 84.4%~101.9%, 相对标准偏差(RSD)为 1.6%~5.6%。该方法准确, 灵敏度高, 重复性好, 适用于植物药材中苯并[α]芘残留的测定。

**关键词:** 苯并[α]芘; 草珊瑚; 固相萃取; 高效液相色谱荧光法

中图分类号: O657.72; O625.15 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2015)06-0711-04

## Determination of Benzo[α] pyrene in *Sarcandra Galbra* by Solid Phase Extraction/High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector

LIN Pu, LIANG Yi-chi, HU Juan\*

(College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**Abstract:** A method was developed for the determination of benzo[α] pyrene in *Sarcandra galbra* by solid phase extraction/high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector. The benzo[α] pyrene in *Sarcandra galbra* was extracted with *n*-hexane, and purified with neutral alumina column. The prepared samples were analyzed by HPLC with fluorescence detector at  $\lambda_{ex}$  = 370 nm and  $\lambda_{em}$  = 425 nm, using acetonitrile - water(85 : 15) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The results showed that a good linearity was achieved in the range of 0 - 20 ng/mL for benzo[α] pyrene with a correlation coefficient of 0.999 9. The limit of quantitation(LOQ) was 0.36 μg/kg. The mean recoveries of benzo[α] pyrene were in the range of 84.4% - 101.9% with relative standard deviations (RSDs) of 1.6% - 5.6%. The method is accurate, sensitive and repeatable, and is suitable for the analysis of benzo[α] pyrene in traditional Chinese herbal medicines.

**Key words:** benzo[α] pyrene; *Sarcandra galbra*; solid phase extraction; high performance liquid chromatography/fluorimetric detection

草珊瑚又名肿节风, 系金粟兰科草珊瑚属植物草珊瑚 *Sarcandra galbra* (Thunb.) Nakai. 的干燥全株。草珊瑚具有抗菌消炎、祛风除湿、活血止痛等功效<sup>[1-2]</sup>。目前以草珊瑚为主要原料的中成药肿节风片、肿节风注射液以及复方草珊瑚含片等已广泛应用于临床, 促进了草珊瑚种植业的持续发展。近年来国内外对草珊瑚化学成分<sup>[3-5]</sup>与药理<sup>[6-9]</sup>进行了大量研究, 但是对草珊瑚中苯并[α]芘残留的测定尚未见文献报道。

苯并[α]芘是一种常见的多环芳烃类高活性致癌物质, 主要来源于石油、煤炭、木材等的不完全燃烧, 大气、水体、土壤均是苯并[α]芘的污染载体, 并能在植物的生长过程中被吸收<sup>[10]</sup>。中药材中的苯并[α]芘除了来源于环境污染外, 还可能在中药材高温烘干、炒制等炮制过程中产生。目前, 药

材中苯并[ $\alpha$ ]芘的污染问题正引起世界各国普遍关注。韩国食品药品监督管理局规定除矿物性韩药材(中药材)外的全部韩药材中苯并[ $\alpha$ ]芘限量为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 欧盟、日本、中国均未对其在中药材中的限量作出明确规定, 但由于部分中药材为药食两性, 所以参考食品中苯并[ $\alpha$ ]芘的限量, 中国和日本均为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 而欧盟为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[11]</sup>。因此, 建立一种快速、准确、可靠的中药材中苯并[ $\alpha$ ]芘残留的检测方法, 不仅有利于中药材的质量安全控制, 更能促进我国中药材的进出口贸易。

目前, 苯并[ $\alpha$ ]芘的检测方法主要有荧光分析法<sup>[12]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[13]</sup>、液相色谱法<sup>[14-18]</sup>等。但荧光法分析复杂混合物时易出现光谱重叠、难以分辨的问题。气相色谱-质谱法虽能够准确地鉴别复杂未知物, 但其对所分析物质的操作温度有较高要求。液相色谱法适用于分析高沸点或在气相色谱所需温度下不稳定的化合物, 液相色谱的优点与其联用的检测器有关, 常用的有质谱与荧光检测器, 二者具有选择性好、灵敏度高特点。液相色谱/荧光法因抗干扰能力强而被广泛应用<sup>[15-18]</sup>。本研究采用固相萃取-高效液相色谱/荧光法测定草珊瑚中苯并[ $\alpha$ ]芘残留, 方法的样品前处理简单, 分离效果好, 测定结果准确性和重复性好, 实用性强, 可为中药材质量安全的控制提供保障。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪配荧光检测器(美国安捷伦公司); BP211D 十万分之一电子天平(北京赛多利斯); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 固相萃取装置(美国 Waters 公司); 旋转蒸发器(德国 IKA 公司); SHZ-82A 恒温振荡器(常州澳华仪器有限公司); TurboVap LV 氮气浓缩装置(瑞典 Biotage 公司); 3K-15 低速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); 6 mL Alumina-N 固相萃取柱。乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 正己烷、环己烷、甲醇、丙酮、二氯甲烷(分析纯, 国药集团)。实验用水为超纯水(18  $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ )。

标准贮备液: 准确称取苯并[ $\alpha$ ]芘标准品 0.005 0 g(纯度 $\geq 98.5\%$ , 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司), 用乙腈溶解并定容至 50 mL 容量瓶中, 配成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准贮备液。于 0~4  $^{\circ}\text{C}$  低温保存, 使用时根据需求以乙腈稀释配成标准工作溶液。草珊瑚药材共 12 批, 分别采自福建、浙江和江西, 经福建中医药大学梁一池教授鉴定, 为金粟兰科植物草珊瑚 *S. glabra* (Thunb.) Nakai 的干燥全草。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 提取** 称取粉碎的草珊瑚样品 1.00 g 于 50 mL 离心管中, 加 25 mL 正己烷于 37  $^{\circ}\text{C}$  的恒温振荡器上振荡提取 30 min, 以 4 000 r/min 转速离心 5 min, 再将上清液转移至 150 mL 梨形瓶中, 残渣用 25 mL 正己烷重提 1 次, 合并提取液, 于 40  $^{\circ}\text{C}$  旋转蒸发至剩余 1~2 mL 液体, 取下梨形瓶, 待净化。

**1.2.2 固相萃取** 先后使用 3 mL 二氯甲烷、5 mL 正己烷在流速约 2 mL/min 条件下活化固相萃取柱, 将提取液转入上述柱子中, 再用 2 mL 正己烷清洗梨形瓶, 转入柱中, 重复洗涤 3 次。用 10 mL 正己烷-二氯甲烷(75:25)混合溶液洗脱, 洗脱溶液收集于 10 mL 离心管中, 氮气吹干。用乙腈-水(85:15)定容至 1.0 mL, 过 0.2  $\mu\text{m}$  滤膜, 按仪器工作条件进行测定。

**1.2.3 色谱条件** 色谱柱: SUPELCO<sup>Discovery</sup>-C<sub>18</sub> 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相: 乙腈-水(85:15); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 检测器波长:  $\lambda_{\text{ex}}=370 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=425 \text{ nm}$ ; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

已有研究表明, 苯并[ $\alpha$ ]芘可用苯、正己烷、环己烷、甲醇、乙腈、丙酮等非极性 or 中等极性有机溶剂提取<sup>[16-18]</sup>。其中, 以苯作提取溶剂效果最佳, 但从安全角度考虑, 苯的沸点低, 挥发性大, 且为致癌物质, 对人体的伤害很大, 也容易造成二次污染, 因此不选用。另比较了正己烷、环己烷、甲醇、乙腈、丙酮对苯并[ $\alpha$ ]芘的提取效果。结果表明, 5 种有机溶剂均能将草珊瑚中的目标物提取出来, 其中正己烷、乙腈、丙酮的提取效果较好, 回收率分别为 95.0%, 92.7% 和 90.2%。但丙酮和乙腈的提取液颜色深, 草珊瑚中极性较大的色素等杂质被同时提出, 给净化带来困难; 而以正己烷作为提取溶剂时, 只有少部分的色素进入提取液, 提取溶剂颜色浅。3 种提取溶剂的样品加标谱图进一步

证实了上述结论(图1),从图中可以看出丙酮、乙腈作为提取溶剂时,第4 min和第18 min左右的基质杂质峰明显比用正己烷为提取溶剂时大。因此本实验采用正己烷作为提取溶剂。

## 2.2 固相萃取条件的选择

由于草珊瑚提取液中的色素较多,活性炭虽对色素有较好的吸附,但会对苯并[ $\alpha$ ]芘产生不可逆吸附,故不宜使用。考虑到中性氧化铝对色素亦有较好的吸附,因此本实验选用中性氧化铝固相萃取柱对样品进行净化。

分别比较了10 mL不同比例的正己烷-二氯甲烷(0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0)为洗脱剂时对草珊瑚空白样品添加5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  苯并[ $\alpha$ ]芘的洗脱效果。结果显示,75:25的正己烷-二氯甲烷混合溶液洗脱效果最好。

进一步比较了不同体积正己烷-二氯甲烷混合溶液(75:25)对添加5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  苯并[ $\alpha$ ]芘的草珊瑚样品的洗脱效果,结果表明,1 mL溶液洗脱时,目标物以及杂质均未被洗脱出来,2 mL溶液洗脱时可收集到目标物,当洗脱溶液体积为6 mL时目标物基本被洗脱,继续增加洗脱溶液体积(7~10 mL),目标物的提取回收率达到稳定。为了保证目标物能完全被洗脱,选用10 mL正己烷-二氯甲烷混合溶液(75:25)作为洗脱液。

优化的固相萃取条件为:以中性氧化铝为固相柱,采用10 mL正己烷-二氯甲烷混合溶液(75:25)洗脱,洗脱液经40  $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮吹浓缩至近干,用乙腈-水(85:15)定容至1.0 mL。

## 2.3 液相色谱条件的选择

固定发射波长420 nm,对苯并[ $\alpha$ ]芘标准溶液在激发波长250~500 nm范围内扫描,发现苯并[ $\alpha$ ]芘在300, 370, 385 nm处有特征峰,300 nm和385 nm处有干扰,而在370 nm处的响应值较强且无干扰峰。因此,固定激发波长为370 nm,对苯并[ $\alpha$ ]芘标准溶液在发射波长250~500 nm范围进行扫描,可观察到在406 nm和425 nm处有特征峰,其中以425 nm处的响应值最大,且干扰峰少。因此实验选择 $\lambda_{\text{ex}}=370$  nm和 $\lambda_{\text{em}}=425$  nm为最佳测定波长。比较了比例分别为70:30, 85:15, 90:10, 95:5的乙腈-水为流动相时的分离效果。结果显示,当乙腈含量较大时,洗脱能力较强,可缩短苯并[ $\alpha$ ]芘的保留时间,但基线漂移较大,且与样品中的部分杂质发生重叠;减小乙腈含量,则基线相对平稳,可改善样品溶液中各色谱峰的分离度,但苯并[ $\alpha$ ]芘的保留时间延长。实验还考察了流动相流速(0.5~2.0 mL/min)对苯并[ $\alpha$ ]芘分离效果的影响,结果发现流速过低会导致峰拖尾现象严重,流速过高又会造成柱压过高,从而损坏色谱柱。综合考虑,选择乙腈-水比例为85:15,流速为1.0 mL/min,该条件下苯并[ $\alpha$ ]芘的分离效果较好,其出峰时间为12.89 min。

## 2.4 实验方法的评价

**2.4.1 线性范围与定量下限** 分别吸取一定体积的标准贮备液,配成浓度为0, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20 ng/mL的系列标准溶液,按选定的色谱条件进样分析,以苯并[ $\alpha$ ]芘的峰面积( $Y$ )对浓度( $X$ , ng/mL)绘制工作曲线。结果表明,在0~20 ng/mL范围内,其线性方程为 $Y=1.797X-0.02117$ ,相关系数( $r$ )为0.9999。以10倍信噪比( $S/N=10$ )计算得方法的定量下限(LOQ)为0.36  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,实验结果表明本方法的灵敏度较高,能满足世界各国对苯并[ $\alpha$ ]芘残留限量的检测要求。

**2.4.2 加标回收率与精密度** 采用草珊瑚空白样品进行加标回收率和精密度实验,样品中添加3个不同浓度(1.0, 2.0, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的标准溶液,在优化条件下测定,每个加标浓度平行测定6次,外标法定量。结果显示,3个不同加标浓度下的平均回收率分别为84.4%, 101.9%, 92.8%;相对标准偏差(RSD)分别为1.6%, 5.6%, 3.5%。图2为草珊瑚空白样品和加标样品的色谱图。

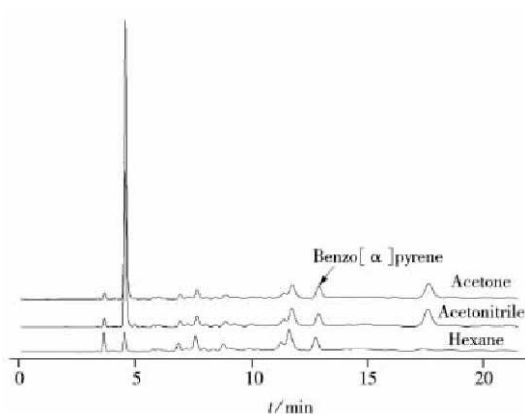


图1 不同提取溶剂提取草珊瑚中苯并[ $\alpha$ ]芘(5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of benzo[ $\alpha$ ]pyrene (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in *Sarcandra galbra* with different extraction reagents

## 2.5 实际样品的检测

通过使用标准方法<sup>[16]</sup>和本方法对采自不同地区的12批草珊瑚样品进行检测,结果均无苯并[ $\alpha$ ]芘检出。

## 3 结论

本文采用正己烷为提取溶剂对草珊瑚样品中的苯并[ $\alpha$ ]芘进行提取,再用中性氧化铝固相萃取柱净化,10 mL 正己烷-二氯甲烷(75:25)为洗脱溶液,建立了固相萃取/高效液相色谱荧光法测定草珊瑚中苯并[ $\alpha$ ]芘残留的分析方法。该方法前处理简单、回收率高、稳定性好,且有效排除了杂质干扰,方法具有较高灵敏度,可满足国内外对苯并[ $\alpha$ ]芘最大残留限量的检测要求。

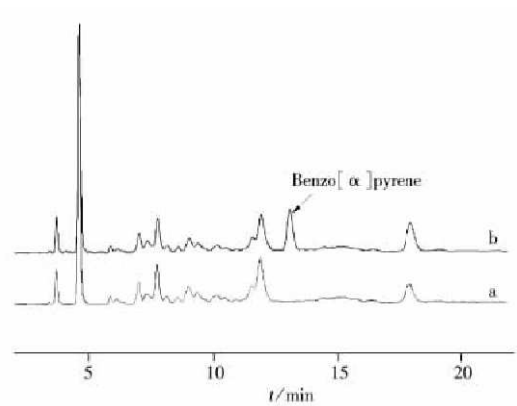


图2 草珊瑚空白样品(a)及其加标(1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  苯并[ $\alpha$ ]芘)样品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of blank sample(a) and spiked sample (1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (b)

### 参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Part 1*. Beijing: China Medical Science and Technology Press(国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 1部. 北京: 中国医药科技出版社), **2010**: 207.
- [2] New Medical School of Jiangsu. *Chinese Medicine Dictionary. Vol. 1*. Shanghai: Shanghai People's Publishing Press(江苏新医学院. 中药大辞典. 上册. 上海: 上海人民出版社), **1997**: 42.
- [3] Duan Y H, Dai Y, Gao H, Ye W C, Yao X S. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(段营辉, 戴毅, 高昊, 叶文才, 姚新生. 中草药), **2010**, 41(1): 29-32.
- [4] Xu Y Q, Liu X L, Huang X F, Ge F. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(徐艳琴, 刘小丽, 黄小方, 葛菲. 中草药), **2011**, 42(12): 2552-2559.
- [5] Zheng X F, Liu H Y, Zhong H M. *Nat. Prod. Res. Dev.* (郑学芳, 刘海洋, 钟惠民. 天然产物研究与开发), **2014**, 26(8): 1221-1224, 1284.
- [6] Li X, Zhang Y F, Yang L, Feng Y, Liu Y M, Zeng X. *Acta Pharm. Sin.* (黎雄, 张玉峰, 杨柳, 冯怡, 刘奕明, 曾星. 药学学报), **2011**, 46(11): 1349-1351.
- [7] Dong W, Xu G L, Zhang Q Y, Shang G B, Li B T, Tang X L. *Pharmacol. Clin. Chin. Mater. Med.* (董伟, 徐国良, 张启云, 尚广彬, 李冰涛, 汤喜兰. 中药药理与临床), **2013**, 29(1): 176-178.
- [8] Zhu X Y, Li T, Li S Y, Zeng Y. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae*(朱晓莹, 李韬, 李盛毅, 曾怡. 中国实验方剂学杂志), **2014**, 20(2): 109-112.
- [9] Jiang Z B, Chen Z L, Li X, Zhao J, Li S M, Hu J P, Zeng X. *Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formulae*(江泽波, 陈泽玲, 黎雄, 赵晋, 李思明, 胡金萍, 曾星. 中国实验方剂学杂志), **2014**, 20(12): 178-182.
- [10] Zhang T B, Wan H F, Yang G Y, Gao Y X, Luo W. *Acta Sci. Circumstantiae*(张天彬, 万洪富, 杨国义, 高原雪, 罗薇. 环境科学学报), **2008**, 28(11): 2375-2384.
- [11] Bo H B. *Chin. J. Pharm. Anal.* (薄海波. 药物分析杂志), **2013**, 33(12): 2119-2122.
- [12] GB/T 5009.27-2003. Determination of Benzo( $\alpha$ )pyrene in Foods. National Standards of the People's Republic of China (食品中苯并( $\alpha$ )芘的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [13] Zhao L, Guo J Z, Zhang T D, Wang Y P, Peng B, Xia Q L, Xie F W, Nie C. *Acta Tab. Sin.* (赵乐, 郭吉兆, 张天栋, 王宜鹏, 彭斌, 夏巧玲, 谢复炜, 聂聪. 中国烟草学报), **2011**, 17(4): 12-15.
- [14] Wang H, Yang H M, Guo Q L, Zhao L, Shi H L, Pan H Y. *J. Instrum. Anal.* (王浩, 杨红梅, 郭启雷, 赵丽, 史海良, 潘红艳. 分析测试学报), **2014**, 33(8): 911-916.
- [15] GB/T 22509.30-2008. Animal and Vegetable Fats Oils - Determination of Benzo( $\alpha$ )pyrene - Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Method. National Standards of the People's Republic of China(动植物油脂苯并( $\alpha$ )芘的测定 反相高效液相色谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [16] Huang L Y, Li X Z, Qin Z F. *Chin. J. Anal. Lab.* (黄鸾玉, 黎小正, 秦振发. 分析实验室), **2009**, 28(12): 63-66.
- [17] He Q, Kong X H, Li J H, Zhao J, Zhang Y. *J. Instrum. Anal.* (何强, 孔祥虹, 李建华, 赵洁, 张莹. 分析测试学报), **2012**, 31(6): 710-714.
- [18] Dai T C, Li W H, Liao Q G, Chen G Y, Wei A H. *J. Instrum. Anal.* (戴廷灿, 李伟红, 廖且根, 陈光宇, 魏爱华. 分析测试学报), **2011**, 30(5): 570-572.