

## 超高效液相色谱法测定贻贝中苯和二甲苯的代谢物

胡芬静<sup>1</sup>, 彭虹晖<sup>2</sup>, 廖思扬<sup>3</sup>, 宋立玲<sup>1</sup>, 傅溢妮<sup>1</sup>, 周秀锦<sup>1\*</sup> (1. 舟山海关综合技术服务中心, 浙江舟山 316000; 2. 舟山福来聚食品有限公司, 浙江舟山 316000; 3. 中华人民共和国杭州海关, 浙江杭州 310007)

**摘要** [目的]建立二极管阵列检测器-超高效液相色谱(PDA-UPLC)法检测贻贝中苯和二甲苯代谢物的方法。[方法]贻贝样品经盐酸水解, 乙酸乙酯提取, 正己烷净化, 以 15 mmol/L 乙酸铵-甲醇为流动相, 检测波长为 235 nm, 流速 0.2 mL/min, Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 柱分离, 外标法定量。[结果]苯和二甲苯代谢物在各自线性范围内呈良好的线性关系( $R^2 > 0.99$ ), 方法检出限为 10.0~25.0 μg/kg, 定量限为 20.0~50.0 μg/kg, 平均回收率在 83.40%~113.10%, 相对标准偏差(RSD)不大于 8.62%。[结论]该方法具有操作简单、准确度和灵敏度较高的特点, 适合贻贝中苯和二甲苯代谢物残留量的测定。

**关键词** 超高效液相色谱法; 苯; 二甲苯; 贻贝; 代谢物

中图分类号 TS254.7 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2022)17-0172-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.17.043



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

### Determination of the Metabolites of Benzene and Xylene in Mussel by Ultra Performance Liquid Chromatography

HU Fen-jing<sup>1</sup>, PENG Hong-hui<sup>2</sup>, LIAO Si-yang<sup>3</sup> et al (1. Zhoushan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau Integrated Technical Service Center, Zhoushan, Zhejiang 316000; 2. Zhoushan Fulaiju Food Co., Ltd., Zhoushan, Zhejiang 316000; 3. Hangzhou Customs District of the People's Republic of China, Hangzhou, Zhejiang 310007)

**Abstract** [Objective] To establish a method for the detection of benzene and xylene metabolites in mussels by photodiode array detector-ultra performance liquid chromatography (PDA-UPLC). [Method] Mussel samples were hydrolyzed by hydrochloric acid, extracted with ethyl acetate, purified with *n*-hexane, then identification and quantification of the concentrate was carried out under the wavelength of 235 nm with the mobile phase consisted of 15 mmol/L ammonium acetate water-methanol at the flow rate of 0.2 mL/min and separated on a Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> column using external standard method. [Result] Benzene and xylene metabolites showed a good linear relationship within their respective linear ranges ( $R^2 > 0.99$ ). The detection limit of the method was 10.0 - 25.0 μg/kg, the quantification limit was 20.0 - 50.0 μg/kg, the average recovery was 83.40% - 113.10%, and the relative standard deviation (RSD) was not more than 8.62%. [Conclusion] The method has the characteristics of simple operation, accurate quality and high sensitivity, and is suitable for the determination of benzene and xylene metabolite residues in mussels.

**Key words** Ultra performance liquid chromatography (UPLC); Benzene; Xylene; Mussels; Metabolites

苯系物作为有机溶剂和稀释剂的主要成分, 已被广泛应用于单独和混合物中其他化学品的合成。已有的研究表明, 苯系物多存在于海水和沉积物中, 由于其生物降解时间长, 对海洋生态系统造成长期和较大的危害<sup>[1-4]</sup>。紫贻贝因营养丰富、肉质鲜美且繁殖速度很快, 目前已经成为主要海水养殖经济贝类之一<sup>[5]</sup>。贻贝是典型的滤食性双壳贝类, 代谢率较低, 被广泛用于全球海洋污染的生物监测中<sup>[6-7]</sup>。N-Acetyl-S-(phenyl)-l-cysteine (PMA) 因其半衰期较长, 和反, 反-粘康酸(*trans, trans*-Muconic acid, MU) 均为有效和敏感的苯代谢标志物<sup>[8-10]</sup>。二甲苯 3 种同分异构体在人体内被氧化成 *o*-、*m*-和 *p*-甲苯酸, 然后与甘氨酸结合, 以 *o*-、*m*-和 *p*-甲基硫酸的形式在尿液中排泄<sup>[11]</sup>。甲基硫酸作为生物标记物研究二甲苯与暴露水平的相关性<sup>[12-13]</sup>。

苯和二甲苯代谢物的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)<sup>[14-16]</sup>、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)<sup>[17-19]</sup>、高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱联用(HPLC-TOF/MS)<sup>[11]</sup>等, 但研究对象大多是尿液、土壤<sup>[20]</sup>、牙齿<sup>[21]</sup>等基质, 前处理方法有直接离心处理、液液萃取和固相萃取等方法。但是目前鲜见贻贝样品中苯和二甲苯代谢物的研究

报道, 该研究贻贝样品采取盐酸酸化、乙酸乙酯提取、氯化钠防止乳化、正己烷脱脂等前处理方法, 结合超高效液相色谱技术, 建立适合贻贝中苯和二甲苯代谢物的二极管阵列检测器-超高效液相色谱(PAD-UPLC)检测方法, 并应用于东海沿岸贻贝中苯和二甲苯代谢物的检测。

#### 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** SHIMADZU Nexera X2 Lc-30A 液相色谱仪配二极管检测器(日本 SHIMADZU 公司); XS105 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); ST-16R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); 氮吹仪(美国 Organomation 公司); 乙腈、甲醇、甲酸、正己烷(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 2-甲基马尿酸(2-MHA)、3-甲基马尿酸(3-MHA)、4-甲基马尿酸(4-MHA)、N-Acetyl-S-(phenyl)-l-cysteine (PMA)、反, 反-粘康酸(MU)标准品(美国 Sigma Chemicals; St. Louis, MO.); 盐酸、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

**1.2 样品前处理** 取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管, 加 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液和 2.0 g 氯化钠, 用均质器以 1 000 r/min 均质 1 min, 20 mL 乙酸乙酯提取, 超声 5 min, 漩涡混合 30 s 后, 4 °C、9 000 r/min 离心 5 min, 收集乙酸乙酯层, 残留物再用 15 mL 乙酸乙酯重复提取一次, 合并乙酸乙酯。收集液在 40 °C 下旋转蒸发浓缩近干, 残渣用 1.0 mL 流动相溶解, 再用 3.0 mL 乙腈饱和的正己烷脱脂 2 次, 下层液体过 0.22 μm 微孔滤膜后, 待测。

**基金项目** 浙江省基础公益研究计划项目(LGN19C190002); 舟山市公益类科技项目(2019C33156)。

**作者简介** 胡芬静(1986—), 女, 浙江舟山人, 助理工程师, 从事食品质量安全与检测研究。\* 通信作者, 高级工程师, 硕士, 从事食品质量安全与检测研究。

**收稿日期** 2021-09-24

**1.3 色谱条件** 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 进样盘温度 4 °C, 柱温 40 °C, 进样量 2.0 μL。流动相 A 相为 15 mmol/L 乙酸铵, B 相为甲醇; 流速 0.2 mL/min, 检测波长为 235 nm, 流动相梯度洗脱如表 1 所示。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution procedure

序号 No.	时间 Time min	流动相 A Mobile phase A//%	流动相 B Mobile phase B//%
1	0.01	97	3
2	1.00	90	10
3	3.00	70	30
4	5.00	70	30
5	6.00	90	10
6	7.10	97	3
7	10.00	97	3
8	10.00	stop	stop

**1.4 测定方法** 在空白贻贝中加入系列浓度的苯和二甲苯代谢物混合标准溶液, 混匀后按“1.2”和“1.3”进行样品前处理和检测, 以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 外标法定量。

## 2 结果与分析

**2.1 色谱条件优化** 苯和二甲苯代谢物属于含有羧基的有机酸类物质, 为获得较高的重现性和分离效果, 流动相中加入一定的酸可以抑制羧基解离, 该研究选取 0.1% 乙酸-甲醇、15 mmol/L 乙酸铵-甲醇和 15 mmol/L 乙酸铵(0.1% 乙酸)-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 其中用 0.1% 乙酸-甲醇为流动相时, 4-MHA 和 3-MHA 分离度不理想; 用 15 mmol/L 乙酸铵(0.1% 乙酸)-甲醇作为流动相, 4-MHA 和 3-MHA 峰型拖尾现象明显; 选择 15 mmol/L 乙酸铵-甲醇为流动相, 梯度洗脱, 目标物色谱峰形尖锐对称。二甲苯代谢物在反相色谱柱及极性流动相中的分离和保留效果较好。考察 Waters ACQUITY UPLC CSH TM C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 和 Waters ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> 色谱

柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 最后选择了分离度更好的 Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱, 在 15 mmol/L 乙酸铵-甲醇溶液流动相体系下, 可以实现 4-MHA 和 3-MHA 分离, 5 种目标物的分离效果见图 1。

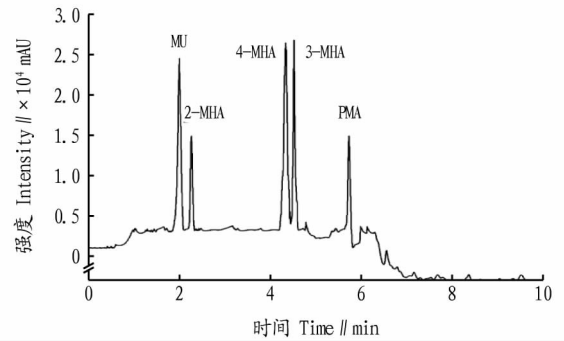


图 1 5 种苯和二甲苯代谢物的标准溶液色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the five metabolites of benzene and xylene standard solution

**2.2 样品前处理的优化** 贝类样品含有丰富的蛋白质、磷脂、分泌黏液、色素等杂质, 基质较为复杂, 常用提取净化方法多为液液萃取。该研究考察了乙酸乙酯、二氯甲烷-异丙醇(5:1)、三氯甲烷-异丙醇(5:1) 3 种提取液的萃取效率, 结果表明 3 种提取液的提取效率没有明显差别, 但是二氯甲烷-异丙醇(5:1) 和三氯甲烷-异丙醇(5:1) 提取液中含有色素基质相对较多, 而乙酸乙酯提取时会出现乳化现象。该研究以乙酸乙酯为提取液, 优化了提取方法, 为防止乳化现象, 加入 2.0 g 氯化钠, 不仅有效防止了乳化现象的发生, 且在均质时最大化地分散了贝类样品, 增大了样品和乙酸乙酯的接触效果, 提高了乙酸乙酯的萃取效率。最后采用正己烷液液分层净化, 有效消除了样品中脂肪的干扰, 最终贻贝样品前处理后二甲苯代谢物回收率为 85.8%~110.6%。

**2.3 线性范围、精密度与检出限** 在优化条件下, 采用贻贝样品基质加标绘制标准工作曲线, 以峰面积对相应质量浓度进行回归分析, 5 种苯和二甲苯代谢物在各自线性范围内呈良好的线性关系( $R^2 > 0.99$ ); 以 3 倍信噪比为基准, 得到 5 种化合物的方法检出限(LOD), 以 10 倍信噪比为基准, 得到方法定量限(LOQ)。具体见表 2。

表 2 苯和二甲苯代谢物的线性方程、决定系数、LOD 和 LOQ

Table 2 Linear equation, determination coefficient, LOD and LOQ of the metabolites of benzene and xylene

化合物 Compound	线性范围 Linear ranges/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	线性方程 Linear equation	决定系数 Determination coefficient( $R^2$ )	LOD $\mu\text{g}/\text{kg}$	LOQ $\mu\text{g}/\text{kg}$
PMA	20.0~200.0	$y = 2\,014.53x + 21.607$	0.999 8	10.0	20.0
MU	50.0~500.0	$y = 2\,907.44x + 16.479$	0.999 5	25.0	50.0
2-MHA	50.0~500.0	$y = 1\,732.42x + 17.618$	0.999 7	25.0	50.0
3-MHA	20.0~200.0	$y = 2\,827.84x + 46.912$	0.999 1	10.0	20.0
4-MHA	20.0~200.0	$y = 3\,021.47x + 24.059$	0.999 3	10.0	20.0

为验证方法的准确度, 在空白贻贝样品中添加高、中、低 3 个不同浓度的苯和二甲苯代谢物进行加标回收试验, 按“1.2”和“1.3”条件检测, 每一浓度平行测定 7 次。结果发现(表 3), 5 种苯和二甲苯代谢物的平均回收率为 83.40%~

113.10%, 相对标准偏差(RSD)不大于 8.62%。

**2.4 实际样品的检测** 随机购买舟山各菜场的贻贝样品, 采用该方法, 检测了东海海域贻贝共 45 个样品中苯和二甲苯代谢物含量, 显示 45 批贻贝样品中均未检测到苯和二甲

苯代谢物,结果表明舟山地区贻贝质量相对安全。

表3 苯和二甲苯代谢物的平均回收率和 RSD

Table 3 Average recovery rate and RSD of the metabolites of benzene and xylene

化合物 Compound	添加量 Added amount μg/kg	回收率 Recovery rate/%	RSD %
PMA	20.0	87.10~110.20	8.17
	50.0	90.88~106.16	5.11
	200.0	92.73~109.56	6.14
MU	50.0	87.84~104.46	6.03
	200.0	89.30~105.40	5.42
	500.0	91.75~105.25	4.20
2-MHA	50.0	88.40~108.20	7.23
	200.0	92.80~110.40	5.50
	500.0	91.68~104.28	4.83
3-MHA	20.0	87.30~113.10	7.96
	50.0	91.20~104.40	5.01
	200.0	85.60~112.80	8.62
4-MHA	20.0	89.90~110.10	8.29
	50.0	88.20~106.10	6.13
	200.0	83.40~107.60	8.10

### 3 结论

该研究建立了贻贝中5种苯和二甲苯代谢物的二极管阵列检测器-超高效液相色谱分析测定方法,结果表明该方法的线性、灵敏度、检出限和回收率等技术指标均满足检测方法的要求。5种苯和二甲苯代谢物的回收率在83.40%~113.10%,相对标准偏差(RSD)不大于8.62%,分离效果和重复性好,应用该方法对本地区的贻贝样品进行了分析,未发现贻贝样品中含有苯和二甲苯代谢物。

### 参考文献

- [1] 王摆,贺凌,高杉,等. 6种苯系物对虾夷扇贝的生殖毒性作用[J]. 生态毒理学报,2014,9(6):1083-1090.
- [2] FERRANDO M D, ANDREU-MOLINER E. Acute toxicity of toluene, hexane, xylene, and benzene to the rotifers *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus plicatilis*[J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1992, 49(2):266-271.
- [3] 范亚维,周启星,王媛媛,等. 水体BTEX污染对大型溞和霍普水丝蚓的毒性效应及水环境安全评价[J]. 环境科学学报,2009,29(7):1485-1490.
- [4] 范亚维,周启星. 水体甲苯、乙苯和二甲苯对斑马鱼的毒性效应[J]. 生态毒理学报,2009,4(1):136-141.

- [5] 陈映,邵卓,桂峰,等. 海水养殖业循环经济能值评价指标的构建应用[J]. 农村经济与科技,2019,30(21):69-71,80.
- [6] BEYER J, GREEN N W, BROOKS S, et al. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review[J]. Marine environmental research, 2017, 130:338-365.
- [7] FARRINGTON J W, TRIPP B W, TANABE S, et al. Goldberg's proposal of "the Mussel Watch": Reflections after 40 years[J]. Marine pollution bulletin, 2016, 110(1):501-510.
- [8] SOLEIMANI E. Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene: Current analytical techniques and approaches for biological monitoring[J]. Reviews in analytical chemistry, 2020, 39(1):168-187.
- [9] FISHBEIN L. An overview of environmental and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. III. Xylene[J]. Sci Total Environ, 1985, 43(1/2):165-183.
- [10] ATSDR. Toxicological Profiles for Xylenes[R]. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2007.
- [11] MARCHESE S, CURINI R, GENTILI A, et al. Simultaneous determination of the urinary metabolites of benzene, toluene, xylene and styrene using high-performance liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid communication in mass spectrometry, 2004, 18(3):265-272.
- [12] OGATA M, TAGUCHI T. Quantitative analysis of urinary glycine conjugates by high performance liquid chromatography: Excretion of hippuric acid and methylhippuric acids in the urine of subjects exposed to vapours of toluene and xylenes[J]. International archives of occupational and environmental health, 1986, 58(2):121-129.
- [13] OGATA M, TAGUCHI T. Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid chromatography[J]. International archives of occupational and environmental health, 1988, 61(1/2):131-140.
- [14] 肖润梅,孙敬智,梅勇,等. HPLC法同时测定尿样中苯、甲苯的4种代谢产物[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(12):2559-2561,2565.
- [15] 张瑰,陈剑刚,潘俊毅,等. 超高效液相色谱法同时测定尿中甲苯、二甲苯、苯乙烯代谢产物[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(16):2295-2297.
- [16] 雍莉,李妍,朱婧,等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法同时分析尿中苯系物的代谢产物[J]. 现代预防医学,2015,42(11):2045-2048.
- [17] ALWIS K U, BLOUNT B C, BRITT A S, et al. Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UP-LC-ESI/MSMS)[J]. Analytica chimica acta, 2012, 750:152-160.
- [18] 王磊君,李钢,郑赛晶,等. 高效液相色谱-质谱联用技术同时测定人体尿液中11种代谢物[J]. 分析化学,2015,43(1):121-126.
- [19] 朱婧,李妍,雍莉,等. 同位素稀释超高效液相色谱串联质谱测定尿液中苯系物和三氯乙烯代谢产物[J]. 分析化学,2016,44(1):81-87.
- [20] SONG H G. Degradation of humus-bound metabolites generated from toluene and o-xylene in soil[J]. International biodeterioration & biodegradation, 2003, 51(2):129-132.
- [21] GONZÁLEZ J L, PELL A, LÓPEZ-MESAS M, et al. Simultaneous determination of BTEX and their metabolites using solid-phase microextraction followed by HPLC or GC/MS: An application in teeth as environmental biomarkers[J]. Science of the total environment, 2017, 603/604:109-117.