

荧光分光光度法测定海洋生物体中石油烃前处理方法优化

付丹^{1,2}, 严力¹, 袁广旺^{1,2}, 吕赢^{1,2}, 孙琦¹, 王荟¹

(1. 江苏省环境监测中心, 江苏 南京 210019; 2. 江苏省海洋环境监测预报中心, 江苏 南京 210019)

摘要: 海洋生物体中的石油烃质量分数是海洋环境监测评价体系的重要指标, 现行分析方法标准为《海洋监测规范 第6部分: 生物体分析》(GB 17378.6—2007) 荧光分光光度法, 该标准方法中前处理操作较为复杂, 实际样品分析中存在样品平行性差、加标回收率范围宽等问题。由于样品均匀性、皂化进程、萃取分离操作手法等因素均会影响样品测定结果的平行性和精密度水平。因此, 对比了不同制备方式的样品(干样和匀浆样), 通过过滤或离心的方式去除了皂化液中的非石油烃大分子干扰; 并对比了不同皂化温度和时间, 获得了最优的前处理方法, 提升了方法的准确度和精密度。对实际海洋生物体样品的分析表明, 优化后的方法检出限为 0.9 mg/kg, 变异系数为 7.02% ~ 14.4%, 加标回收率为 67.4% ~ 138%, 精密度和准确度良好, 基本满足海洋生物体中石油烃测定的要求。

关键词: 海洋生物体; 石油烃; 荧光分光光度法; 大分子干扰; 过滤; 离心

中图分类号: X834

文献标志码: B

文章编号: 1674-6732(2023)03-0058-05

Optimization of Pre-treatment Methods for Fluorescence Spectrophotometric Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organisms

FU Dan^{1,2}, YAN Li¹, YUAN Guangwang^{1,2}, LV Ying^{1,2}, SUN Qi^{1,2}, WANG Hui¹

(1. Jiangsu Provincial Environmental Monitoring Center, Nanjing, Jiangsu 210019, China; 2. Jiangsu Marine Environmental Monitoring Forecasting Center, Nanjing, Jiangsu 210019, China)

Abstract: Petroleum hydrocarbon in marine organisms is an important indicator of the marine environmental monitoring and evaluation mechanism. It is analyzed by fluorescence spectrophotometric method using "Marine Monitoring Specification Part 6: Analysis of Organisms" (GB 17378.6—2007). However, due to the complexity of the pre-treatment operation in the standard method, problems such as poor parallelism and wide range of spiked recoveries were found in the actual sample analysis. As sample homogeneity, saponification process and extraction practices can affect detection parallelism and precision, different sample preparation methods (dry and homogenised samples) were contrasted and filtration or centrifugation was used to remove non-petroleum hydrocarbon macromolecule interference from the saponification solution. In addition, different saponification temperature and time were compared to obtain appropriate pre-treatment operation. The accuracy and precision of the method were improved by comprehensive improvements to the current standard. The analysis of marine organism samples showed that the detection limit of the method was 0.9 mg/kg, the precision level was 7.02% ~ 14.4%, and the spiked recovery ranged from 67.4% to 138% with well reproducibility. This study provides a technical basis for the marine environmental monitoring and evaluation system.

Key words: Marine organisms; Petroleum hydrocarbons; Fluorescence spectrophotometry; Macromolecular interference; Filtration; Centrifugation

海洋石油类污染物可以通过生物富集和营养级联放大效应影响人类健康^[1]。近年来, 海洋石

收稿日期: 2022-04-29; 修订日期: 2022-05-25

基金项目: 江苏省环境监测科研基金资助项目(2103, 2002)

作者简介: 付丹(1991—), 男, 工程师, 硕士, 主要从事环境监测工作。

油污染问题时有发生,使得对海洋生物体中石油烃的监测显得尤为重要^[2]。现行海洋生物体石油烃分析方法为《海洋监测规范 第 6 部分:生物体分析》(GB 17378.6—2007)中的荧光分光光度法^[3],该方法经过不断修订,已不再使用氟利昂萃取和使用环己烷复溶皂化液。现行方法使用二氯甲烷替代氟利昂作为萃取溶剂,石油醚替代环己烷复溶皂化液,解决了氟利昂可能对环境产生污染的问题,已广泛运用于海洋监测评价体系。

采用《GB 17378.6—2007》中的荧光分光光度法制备和分析样品时,样品制备方式、前处理方式和荧光分析方法^[4-6]等均对分析结果具有较大的影响,进而影响测定结果的平行性和回收率。同时,该方法检出限根据《环境监测分析方法标准制订技术导则》(HJ 168—2020)的要求进行复现时,测定检出限约为方法检出限的 3~5 倍。由于方法在部分操作细节上未给出充分的注释,对新接触本方法的实验室分析人员具有较大的挑战。样品分析时,没有分离出非石油烃等大分子干扰物,会使石油醚复溶液中出现浑浊,荧光分析时干扰较大,使得测定结果的平行性较差,加标回收率范围大,难以满足监测分析质量管理的要求。

现采用不同的样品制备方式和前处理方式,通过对干样和匀浆样皂化液的离心和过滤、皂化温度、皂化时间等前处理过程和条件进行优化,提升样品分析的复现性水平,保证方法的稳定性和可操作性,以期对海洋环境分析质量管理体系的完善提供技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Agilent 公司); Sigma 3-18k 高速离心机(德国 Sartorius 公司); 恒温培养摇床(德国 IKA 公司); 聚四氟乙烯(PTFE)滤膜(0.2 μm , 美国 Waters 公司); 尼龙 66 滤膜(0.45 μm , 天津津腾实验设备有限公司); 醚砜滤膜(0.45 μm , 上海安谱实验科技股份有限公司); PTFE 滤膜(0.45 μm , 上海安谱实验科技股份有限公司); 玻璃离心管(50 mL, 定制); 氟化乙烯丙烯共聚物(FEP)离心管(50 mL, 美国 ThermoFisher 公司)。

试剂: 二氯甲烷(HPLC 级, 德国 Merck 公司); 石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$, HPLC 级, 德国 Merck 公司); 氢

氧化钠(98.5%, 美国 ACROS 公司); 无水乙醇(HPLC 级, 德国 Merck 公司); 海洋环境监测石油成分分析标准物质(国家海洋环境监测中心); 石油类荧光法标准样品(国家海洋环境监测中心)。

1.2 样品采集与制备

1.2.1 样品采集

按照《海洋调查规范 第 6 部分 海洋生物调查》(GB/T 12763.6—2007)要求, 游泳动物采集到鲢鱼、鳙鱼、鲈鱼、梭子蟹、葛氏长臂虾等鱼虾类样品, 根据《海洋监测规范 第 3 部分: 样品采集、贮存与运输》(GB 17378.3—2007)要求, 生物体样品采集到文蛤、扇贝、菲律宾蛤仔等贝类样品。

1.2.2 样品制备与前处理

使用实验室蒸馏水洗净生物样品, 鱼类剥皮取肌肉组织, 虾类取腹部肌肉, 蟹类取螯和腹腔肌肉组织, 贝类取去除内脏的软组织。样品经匀浆处理后取 3.0 g 匀浆样皂化; 匀浆后的样品冷冻干燥, 研磨过筛, 取 1.0 g 干样皂化。

1.3 样品分析

按照《GB 17378.6—2007》要求, 向制备好的干样和匀浆样中分别加入 6 mol/L 的氢氧化钠溶液 20 mL, 皂化反应 8~48 h 后, 加入 20 mL 无水乙醇充分摇匀, 水解 4 h 后用二氯甲烷萃取 2 次, 萃取过程中使用饱和氯化钠溶液进行破乳, 将 2 次萃取液合并并旋蒸至近干, 使用氮吹吹干, 定量加入 10 mL 石油醚复溶, 待测, 同时分析实验室空白。制备工作曲线时, 将质量浓度梯度为 1, 3, 5, 7 和 9 mg/L 的样品进行相同的前处理步骤。制备的皂化液于激发波长 310 nm, 发射波长 360 nm 处进行荧光测定。

1.3.1 皂化反应条件优化

生物体样品须皂化至透明方表明皂化完成, 不同温度对皂化过程具有显著的影响^[7]。为了探索最优皂化反应条件, 选取了鲢鱼样品, 分别对其干样和匀浆样在 10, 25 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 这 3 个温度梯度, 12, 18 和 24 h 这 3 个时间梯度下的皂化效果进行比较。

1.3.2 工作曲线条件优化

生物体石油烃使用工作曲线作为校准方式, 使用 0.2 μm PTFE 滤膜过滤分离石油醚复溶试剂, 同时考虑到温度可能会造成石油烃样品的损失, 对工作曲线皂化温度也采用相同的条件进行比对, 设置皂化温度分别为 10, 25 和 45 $^{\circ}\text{C}$, 验证温度对工作曲线的影响。

1.3.3 过滤和离心方法的优化

生物体样品皂化后经二氯甲烷萃取,生物体中非石油类大分子化合物会随石油烃同时被萃取,并在氮吹时析出,使用石油醚复溶后,由于溶解度的影响,导致其在石油醚中存在浑浊现象,在荧光分析时对荧光强度产生干扰,影响分析结果的准确性和重复性。因此,比较了多种过滤和离心方法对于去除非石油类大分子化合物干扰的效果。离心法使用玻璃离心管和 FEP 离心管等离心方式;过滤法则使用玻璃注射器配以不同的针头滤膜,包括 0.45 μm 尼龙 66 滤膜、0.2 μm PTFE 滤膜、0.45 μm 醚砜滤膜及 0.45 μm PTFE 滤膜等。鲮鱼匀浆样平行样品、干样平行样品、匀浆样加标样品及干样加标样品(加标质量浓度均为 3 mg/L)均采用了上述过滤和离心方法。同时配置相同质量浓度的标准溶液,验证不同分离方法对标准样品的干扰效果。

1.3.4 检出限的测定

根据《HJ 168—2020》附录 A 方法检出限的一般确定方式,使用质量浓度值为预估方法检出限值 3~5 倍的菲律宾蛤仔匀浆样、干样和低质量浓度的空白加标样,进行 7 次重复测定,使用 0.2 μm PTFE 滤膜过滤分离石油醚复溶试剂,25 ℃室温下皂化,计算测定结果的标准偏差和方法检出限。

1.3.5 精密度和准确度的测定

使用 0.2 μm PTFE 滤膜过滤分离,25 ℃室温下皂化,选取鲮鱼、菲律宾蛤仔、葛氏长臂虾 3 种海

洋生物体的匀浆样和干样,分别进行 6 次重复测定,验证方法的精密度;皂化时,对匀浆样和干样分别加入 3 mg/L 海洋环境监测石油成分分析标准物质,验证分析方法的准确度。

1.4 质量控制

《GB 17378.6—2007》中,荧光分光光度法测定石油烃的检出限为 0.2 mg/kg(湿含量)。

2 结果与讨论

2.1 皂化温度和时间对工作曲线和生物体样品的影响

皂化温度和时间对工作曲线和生物体样品的影响见表 1。由表 1 可见,皂化温度为 10 ℃时,相关系数(r)为 0.999 5;匀浆样和干样经过 24 h 依然存在少量固体悬浮物,说明温度较低,致使皂化不完全。皂化温度为 25 ℃时, r 为 0.999 4;匀浆样经过 12 h 即变为淡黄色澄清体系,皂化完全,干样经过 18 h 方可皂化完全。皂化温度为 45 ℃时,线性较差, $r < 0.995$;匀浆样和干样经过 12 h 即可变为澄清透明体系,皂化完全。

通过含水率换算,1 g 干样约为 5 g 经 80 目筛选的匀浆样制备而来,因此在皂化温度为 25 ℃时,干样比匀浆样需要更长的消解时间。10 和 25 ℃皂化温度对石油成分不产生影响,45 ℃皂化温度对石油成分产生影响,该结果与王倩等^[8-11]的研究结果一致,这可能是因为较高的温度会导致部分低沸点石油烃的损失,从而影响测定结果。因此,选择 25 ℃作为皂化温度。

表 1 皂化温度和时间对工作曲线和生物体样品的影响

项目	皂化温度/℃		
	10	25	45
工作曲线	$y = 38.6x - 4.57$	$y = 37.1x + 6.09$	
r	0.999 5	0.999 4	<0.995
匀浆样(12 h)	较多固体悬浮物	淡黄色,较为澄清	淡黄色,澄清
干样(12 h)	较多固体悬浮物	淡黄色,少量固体悬浮物	淡黄色,澄清
匀浆样(18 h)	少量固体悬浮物	淡黄色,较为澄清	淡黄色,澄清
干样(18 h)	少量固体悬浮物	淡黄色,少量悬浮物	淡黄色,澄清
匀浆样(24 h)	少量固体悬浮物	淡黄色,澄清	淡黄色,澄清
干样(24 h)	少量固体悬浮物	淡黄色,较为澄清	淡黄色,澄清

2.2 过滤和离心对生物体样品干扰去除的影响

不同分离方法对生物体样品干扰去除的影响见表 2。由表 2 可见,使用玻璃离心管,以 3 000 r/min 的转速离心,由于速率过低,无法分离皂化萃取液中的大分子干扰物,增大转速至

4 500 r/min 时,玻璃离心管开始碎裂,无法达到分离的目的。FEP 离心管的离心速率可达 12 000 r/min,可以有效分离干扰物,经过多次反复验证,匀浆样回收率为 75.8%~119%,干样回收率为 64.3%~113%,空白加标结果显示离心管本

身几乎不产生系统干扰。0.45 μm 尼龙 66 滤膜能够有效去除过量的难溶性大分子干扰物,匀浆样回收率为 71.6% ~ 140%,干样回收率为 62.8% ~ 125%,空白加标结果显示滤膜存在 8.1% 的负干扰。0.2 μm PTFE 滤膜能够有效去除过量的难溶性大分子干扰物,匀浆样回收率为 77.0% ~ 105%,干样回收率为 72.6% ~ 104%,空白加标结果显示滤膜不存在干扰。0.45 μm 醚砜滤膜能够有效去除过量的难溶性大分子干扰物,匀浆样回收率为 67.0% ~ 128%,干样回收率为 63.6% ~ 118%,空白加标结果显示滤膜存在 10.5% 的负干扰。0.45 μm PTFE 滤膜能够有效去除过量的难溶性大分子干扰物,匀浆样回收率为 69.3% ~ 105%,干样回收率为 85.7% ~ 112%,空白加标结果显示滤膜存在 7.3% 的负干扰。综上,0.2 μm PTFE 滤膜从加标回收率和系统干扰上均能够达到

最优效果;FEP 离心管、0.45 μm 尼龙 66 滤膜、0.45 μm 醚砜滤膜和 0.45 μm PTFE 滤膜也能达到干扰去除的效果。上述各方法的回收率范围均比较广,样品的平行性依然较差,可能是由于样品均匀性、皂化进程、萃取分离操作手法等因素的影响,通过使用更均匀的样品,控制好皂化温度和时间,减少萃取和置换溶剂的损失能够更大程度地保证样品的平行性。

使用过滤或离心分离出非石油烃大分子干扰的方法,与不分离直接分析的方法进行比对,结果表明,不分离直接分析时,存在荧光分光光度测量值超出仪器量程的情况,无法获得准确的荧光值,自然沉降 1 h 后,仍未获得明显的好转。因此,对可能存在较多的非石油烃类大分子的海洋生物,需要进行离心和过滤,分离出非石油烃大分子干扰物才能得出更准确的荧光分析结果。

表 2 不同分离方法对生物体样品干扰去除的影响^①

分离方法	材料	能否分离	ω (匀浆样)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	匀浆样 回收率/%	ω (干样)/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	干样回收率/ %	系统干扰/%
离心	玻璃离心管	否					96.4
	FEP 离心管	是	16.7	75.8 ~ 119	17.8	64.3 ~ 113	97.6
过滤	0.45 μm 尼龙 66 滤膜	是	17.5	71.6 ~ 140	17.4	62.8 ~ 125	91.9
	0.2 μm PTFE 滤膜	是	16.9	77.0 ~ 105	17.7	72.6 ~ 104	100
	0.45 μm 醚砜滤膜	是	15.5	67.0 ~ 128	15.0	63.6 ~ 118	89.5
	0.45 μm PTFE 滤膜	是	15.9	69.3 ~ 105	16.9	85.7 ~ 112	92.7

①匀浆样和干样的质量分数均为湿含量。

2.3 检出限

生物体匀浆样和干样的检出限见表 3。由表 3 可见,匀浆样测定检出限为 0.9 mg/kg ,干样测定检出限为 0.8 mg/kg ,低质量分数空白加标样品检出限(以取 3.0 g 匀浆样计算)为 0.7 mg/kg ,均比

《GB 17378.6—2007》中的检出限(0.2 mg/kg)高。根据样品测定的荧光值,在给定的仪器条件下,空白加标量约为检出限的 3 ~ 5 倍,荧光测定结果的不稳定性,导致实际计算检出限达不到方法检出限要求。

表 3 生物体匀浆样和干样的检出限($n=7$)^①

样品	匀浆样测定结果		干样测定结果		空白加标测定结果	
	荧光值	$\omega/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	荧光值	$\omega/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	荧光值	$\omega/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
1	20.354	1.49	37.345	2.05	6.753	0.60
2	17.345	1.55	33.316	1.79	8.147	0.74
3	21.273	1.88	41.574	2.31	4.221	0.35
4	16.377	1.20	36.219	1.96	3.354	0.26
5	22.132	1.80	43.348	2.38	3.257	0.25
6	25.372	2.00	45.175	2.45	7.150	0.64
7	19.465	1.48	38.947	2.12	3.040	0.23
标准偏差(S)/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		0.28	0.24		0.22	
检出限(MDL)/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		0.9	0.8		0.7	
测定下限/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		3.6	3.2		2.8	

①质量分数均为湿含量,空白荧光值为 2.556。

根据实际方法验证结果发现,《GB 17378.6—2007》中多种项目按《HJ 168—2020》的检出限测定方法,其结果难以满足方法给定的检出限要求,推测《GB 17378.6—2007》中的检出限并非按照《HJ 168—2020》的方法进行计算,可能采用仪器检出限或者直接引用国内外经典方法得到。此外,《GB 17378.6—2007》4.2.4 测试方法的验证中,部分测试方法采用国内外经典方法,其性能指标多数引自原稿,此处未再进行进一步验证。

2.4 精密度和准确度

生物体样品精密度和准确度见表 4。由表 4 可见,3 种海洋生物体使用匀浆样和干样分析时,变异系数(CV)为 7.02%~14.4%;采用匀浆样分析时,CV 整体比采用干样分析时大,可能是因为匀浆样为匀浆机打磨后的样品,均匀性相对较差,而干样为冻干之后研磨过筛的样品,均匀性相对较好。加标回收率为 67.4%~138%,回收率范围比较广,相较于未离心分离和过滤的样品,准确度明显改善。

表 4 生物体样品精密度和准确度 (n=6)

样品	ω (鲑鱼)/(mg·kg ⁻¹)		ω (菲律宾蛤仔)/(mg·kg ⁻¹)		ω (葛氏长臂虾)/(mg·kg ⁻¹)	
	匀浆样	干样	匀浆样	干样	匀浆样	干样
1	12.8	11.8	21.3	18.7	7.07	10.9
2	9.90	11.5	16.6	23.2	7.65	9.75
3	13.2	10.9	15.8	19.8	9.33	11.7
4	10.4	12.9	20.4	23.2	8.04	11.5
5	9.38	13.2	18.0	22.1	10.2	10.2
6	12.2	13.5	18.8	22.8	8.57	11.0
平均值/(mg·kg ⁻¹)	11.3	12.3	18.5	21.6	8.48	10.8
标准偏差(S)/(mg·kg ⁻¹)	1.63	1.05	2.13	1.91	1.15	0.76
变异系数(CV)/%	14.4	8.60	11.5	8.80	13.5	7.02
加标量(标液)/(mg·L ⁻¹)	3	3	3	3	3	3
加标回收率/%	75.3	108	138	127	67.4	88.1

3 结语

按照《GB 17378.6—2007》分析海洋生物体中石油烃时,由于未去除非石油烃大分子干扰物,存在荧光分光光度测量值超出仪器量程的情况,无法获得准确的荧光值。采用滤膜过滤或者离心石油醚复溶后的皂化液,可达到消除非石油烃大分子干扰的目的,同时控制皂化温度,优化皂化效率,避免石油烃损失。对实际海洋生物体样品的分析结果表明,优化后方法检出限为 0.9 mg/kg,变异系数为 7.02%~14.4%,加标回收率为 67.4%~138%。该方法简单可行,检出限、精密度和准确度水平基本满足方法对海洋生物体中石油烃测定的要求,可为我国海洋环境监测、调查和科研工作提供一定的技术参考。

[参考文献]

[1] 王召会,胡超魁,吴金浩,等. 辽东湾海域生物体内石油烃污染状况[J]. 环境科学学报,2016,36(1):327-334.

[2] 贾晓平,林钦,蔡文贵,等. 海洋动物体石油烃污染评价标准参考值的探讨[J]. 湛江海洋大学学报,1999,19(3):36-40.

[3] 国家海洋环境监测中心. 海洋监测规范 第 6 部分:生物体分析:GB 17378.6—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

[4] 李静. 荧光法测定海洋生物体中石油烃[J]. 生物化工,2019,5(5):111-113.

[5] 张海燕,周德庆. 荧光分光光度法测定水产品中石油烃的方法研究[J]. 海洋水产研究,2008,29(4):106-111.

[6] 贾晓平,林钦. 荧光分光光度法测定海洋贝类体总石油烃的方法研究[J]. 湛江海洋大学学报,1999,19(4):32-37.

[7] 赵燕. 鲢鱼鱼肉中石油烃污染的红外光谱检测方法的研究[D]. 无锡:江南大学,2009.

[8] WARNER J S. Determination of aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine organisms[J]. Analytical Chemistry, 1976, 48(3):578.

[9] 王静芳. 荧光分光光度法测定贻贝中石油烃总量的方法研究[J]. 海洋环境科学,1986(4):92-107.

[10] 王倩,邵秘华,陶平. 荧光法测定海洋生物体中石油烃总量[J]. 大连海事大学学报,2006,32(1):53-55.

[11] PICER M. Simple spectrofluorometry methods for estimating petroleum hydrocarbons levels in various sea benthic organisms[J]. Chemosphere,1998,37(4):607-617.