

反向微乳毛细管电泳法在线富集技术灵敏 检测化妆品中的多环芳烃

陈新 倪鑫炯 张佳瑜 刘瑛 曹玉华*

(江南大学化学与材料工程学院, 食品胶体与生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122)

摘 要 建立了反向微乳毛细管电泳(MEEKC) 在线富集技术灵敏检测多环芳烃的方法。采用大体积进样-pH 动态连接-扫集微乳毛细管电泳法(LVSS-DypH-MEEKC) 对于常规条件下很难分离的 6 种强亲脂性的多环芳烃中性分子进行富集分离。结果表明, 在反相电压下, 当微乳液的组成为: 2.4% (*w/w*) SDS、0.6% (*w/w*) 正辛烷、6.6% (*w/w*) 正丁醇、20 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液(pH 2.2); 进 HCB 时间为 20 s(16 kPa), 进样时间为 80 s(16 kPa) 时, 富集效果良好, 富集倍数在 25 ~ 80 倍之间, 在 27 min 内实现了对多环芳烃化合物的灵敏检测。将本方法用于化妆品中多环芳烃的检测, 回收率在 90.6% ~ 95.9% 之间, 相对标准偏差均小于 5.1% (*n* = 5)。

关键词 微乳毛细管电泳; 大体积进样; pH 动态连接; 扫集; 多环芳烃(PAHs)

1 引 言

多环芳烃(PAHs) 多为脂溶性高、疏水性强的中性分子, 可诱发皮肤癌、阴囊癌和肺癌, 是重要的环境和食品污染物。《化妆品卫生规范》^[1] 规定, 苯并[*g,h,i*]芘、二苯并[*a,h*]蒽、苯并[*a*]芘、苯并[*b*]荧蒽、苯并[*a*]蒽、荧蒽等多环芳烃化合物为化妆品中禁用物质。目前, PAHs 的主要分析技术有高效液相色谱法(HPLC) ^[2-4] 和气相色谱法(GC) ^[5-7]。有些 PAHs 不能用 GC 直接分析。而对于结构相似的 PAHs 利用 HPLC 分析, 灵敏度和分离度均较低。毛细管电泳方法具有仪器简单、操作方便、分离效率高、分析速度快、操作模式多等特点, 越来越广泛地应用于各类样品的分析。目前已有一些利用胶束毛细管电泳(MEKC) ^[8-9] 和填充毛细管色谱(CEC) ^[10] 成功分离 PAHs 的报道。但是传统毛细管电泳方法的检测灵敏度较低, 不能满足质量监控要求。在线富集技术仅通过对缓冲液组成和进样程序进行调控就可显著提高检测灵敏度, 近年来成为毛细管电泳分析领域的研究热点^[11,12]。在线富集技术大致可分为样品堆积技术^[13]、扫集术^[14]、等速电泳^[15]等, 其中堆积技术往往在进样时实现, 可与后几种技术联用, 进一步改善灵敏度。

大体积进样电堆积是常规电堆积模式的一种特殊形式, 能有效克服常规堆积技术进样体积的限制, 使检测灵敏度提高两个数量级以上^[16]。在 MEEKC 方法中, 样品与含有更高容量因子的微乳粒子的作用增强, 浓缩程度增加, 使检测灵敏度显著提高。本研究采用大体积进样、pH 动态连接及扫集相联用的方式对 PAHs 进行富集分离, 通过改变携带分析物前进的微乳粒子的迁移速度, 在 pH 连接区带上产生堆积, 不需要转变极性就可以实现大体积进样堆积, 进而实现对 PAHs 的灵敏检测。本方法不仅可以用于多环芳烃的检测, 而且为结构及性质较为相近的其它中性化合物的分离富集提供了参考。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

JA2003 电子分析天平(上海分析天平仪器厂); CAPEL105 高效毛细管电泳系统, 配有 Lumex 紫外检测器(俄罗斯), 反向电压 0 ~ 30 kV, 可调; HS3120D 超声波振荡器(天津恒奥科技发展有限公司); 未涂层石英毛细管(65 cm × 75 μm , 有效长度 50 cm); 未涂层石英毛细管(65 cm × 50 μm , i. d., 有效长度

2014-09-17 收稿; 2014-10-16 接受

本文系国家质量监督检验检疫总局资助项目(No. 2010IK183)

* E-mail: cxgxp@hotmail.com

为 55 cm, 河北永年光纤); 0.45 μm 微孔滤膜(吉安市青原区庆丰过滤器材有限公司); 台式高速离心机(无锡市瑞江分析仪器有限公司)。

PAHs: 荧蒽, 苯并[a]蒽, 苯并[b]荧蒽, 苯并[a]芘, 二苯并[a,h]蒽, 苯并[g,h,i]芘(德国 DR 公司); 其余试剂均为分析纯; 超纯水(华晶微电子有限公司)。

2.2 标准和样品的制备

标准溶液配制: 准确称取 6 个标准品, 用二氯甲烷及乙醇溶解并定容至 5 mL, 配成 2 g/L 的贮备液, 在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。

样品溶液的制备: 准确称取 2.00 g 待测化妆品, 加入 10 mL 正己烷-丙酮(1:1, V/V) 溶液, 超声 20 min 后, 利用高速离心机离心 5 min, 取上清液, 在下层残渣中再加入 10 mL 正己烷-丙酮(1:1, V/V) 溶液, 操作方法同上, 重复提取 3 次, 合并上清液; 膏霜类化妆品在上述步骤基础上再重复提取两次上层清液, 合并上清液。将上清液放入冰箱内冷冻 5 min; 冷冻后的提取液用 0.45 μm 过滤膜过滤, 并定容于 50 mL 容量瓶中。将滤液再用二氯甲烷液液萃取 4 次, 每次 10 mL, 合并上层二氯甲烷相, 浓缩至约 2 mL。

2.3 微乳毛细管电动色谱条件

微乳液的组成为: 2.4% (w/w) SDS、0.6% (w/w) 正辛烷、6.6% (w/w) 正丁醇、20 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液(pH 2.2)。

高导缓冲液(HCB)组成为: 20 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2)-乙腈(80:20, V/V)。

样品基质为: 2.4% (w/w) SDS、0.6% (w/w) 正辛烷、6.6% (w/w) 正丁醇、0.2 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 7.8)、20% 乙腈。

紫外检测波长为 280 nm, 运行电压为 -20 kV , 温度为 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 LVSS-DypH-sweep MEEKC 运行模式

图 1 是 LVSS-DypH-sweep 的原理图。毛细管先用含有胶束的缓冲液冲洗, 然后在毛细管中注入低 pH 值的高导缓冲液(HCB), 用于收集大体积进样的样品(图 1A); 样品溶在高 pH 值的样品基质中, 分析物带负电荷并且向检测器方向迁移, 在毛细管两端加了合适的电压后, 电渗流(EOF)应指向进口端(如图 1B), 样品区和 HCB 区的接触界面附近产生一个 pH 动态连接区带, 在电渗和电泳的合力下, 低 pH 值 HCB 区带中的 H^+ 向负极方向(进口端)移动, 与样品区带中的 OH^- 发生中和作用, 样品区带转变成低导区域, 分析物速度增加; 快速移动的分析物从碱性样品区带分离, 并且被酸性 HCB 区带质子化变成中性, 迁移速度接近于零, 在 pH 连接区带发生堆积产生富集效应。在毛细管两端换上胶束运行缓冲液, 当胶束穿过样品区带时, 样品在胶束相中分配富集, 并被胶束带着向前运动。随着分离的进行, 样品区带不断缩短, 样品浓度不断浓缩, 从而实现了二次富集(如图 1C)。富集完成后, 按照 MEEKC 方法分离(如图 1D)。

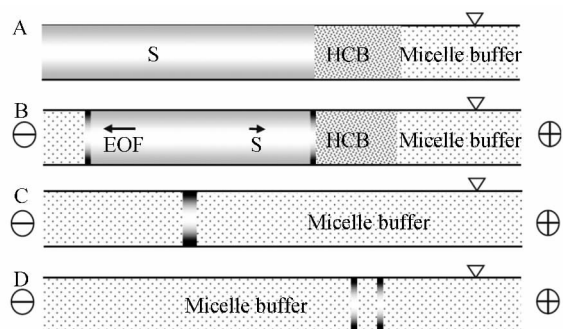


图 1 LVSS-DypH-sweep 原理图。(A) 大体积进样; (B) 动态 pH 连接; (C) 扫集; (D) MEEKC 模式分离

Fig. 1 Schematic diagram of large volume sample stacking-dynamic pH junction (LVSS-DypH)-sweep. (A) LVSS; (B) pH junction; (C) Sweep; (D) Microemulsion electrophoretic chromatography (MEEKC)

3 结果与讨论

3.1 SDS 浓度的影响

表面活性剂 SDS 浓度对形成微乳液的稳定性有重要影响。较低的表面活性剂浓度会减少分析时间, 但同时也会降低界面张力, 使得到的微乳体系不稳定。当 SDS 浓度低于 2.4% 时, 在反向富集的过程中会出现破乳现象, 堵塞毛细管; 当 SDS 浓度在 2.4% ~ 6.6% 之间变化时, 由图 2 可知, 随着 SDS 浓度的增加, 分析物的保留时间延长, 分离度减弱。因此 SDS 的最佳浓度选择 2.4%。

3.2 缓冲液 pH 值和浓度对分离的影响

当缓冲液的 pH < 3.0 时,能够有效抑制电渗流。当缓冲液在 pH 1.8 ~ 3.0 范围内变化时, pH 值对各组分的分离度影响较小,但随着 pH 值增大,迁移时间延长。因此确定缓冲液的 pH = 2.2。固定缓冲液的 pH = 2.2,考察了 NaH_2PO_4 的浓度对于分析结果的影响。当 NaH_2PO_4 的浓度在 10 ~ 50 mmol/L 范围内时,缓冲液浓度的增加对 PAHs 分离度的影响较小,但分析时间延长。故本实验选用 20 mmol/L NaH_2PO_4 缓冲液(pH 2.2)为运行液。

3.3 样品液基质组成及浓度

多环芳烃是强疏水性物质,基质需要采用脂溶性较强的溶液,为了让大体积进样的基质能排出毛细管,需要将基质调节成弱碱性,使电渗流方向指向入口端与样品适度分开。经过考察,采用 2.4% (w/w) SDS-0.6% (w/w) 正辛烷-6.6% (w/w) 正丁醇-0.2 mmol/L 硼砂缓冲液(pH 7.8)-乙腈(80:20, V/V)作为样品液基质。

3.4 进样时间和进 HCB 时间优化

动力学进样的灵敏度受到毛细管管长的制约,在动态 pH 连接扫集方法中,动力学进样的体积一般为管长的 20% 或 22%^[17]。实验考察了样品进样体积的限值(40 ~ 90 s/16 kPa),发现进样时间过长,会导致堆积效率降低、峰展宽。

实验表明,加入 HCB 区带能够克服峰展宽,堆积效率提高,当分析物进入到 HCB 区带中时,由于它的高导低场使分析物迁移速度降低,产生堆积效应。如图 3 所示,未加入 HCB,峰形有所展宽,峰顶部出现平台峰;而加入 HCB 后,峰形尖锐、灵敏度增加。

对 HCB 区带的长度和进样时间进行了优化。当进 HCB 区带的时间为 20 s(16 kPa)时,进样的体积(80 s, 16 kPa)可以达到管长的 50% 左右,并且获得了较高的检测灵敏度。

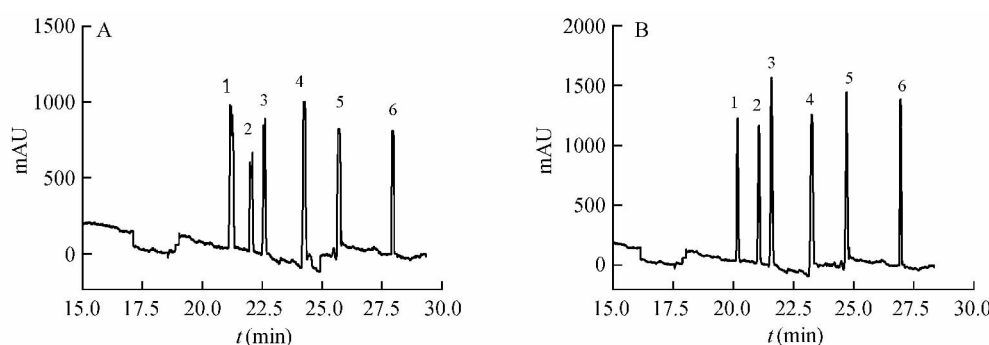


图3 HCB对富集的影响(A)未加HCB和(B)16 kPa 20 s HCB: 20 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 2.2)-10% 甲醇,峰编号及标准溶液浓度: 1. 苯并[g,h,i]芘 4.38 mg/L, 2. 二苯并[a,h]蒽 7.5 mg/L, 3. 苯并[a]芘 8.75 mg/L, 4. 苯并[b]荧蒽 5 mg/L, 5. 苯并[a]蒽 5 mg/L, 6. 荧蒽 2.5 mg/L。

Fig.3 Effect of high conductive buffer solution (HCB) on stacking (A) without and (B) with HCB zone by 16 kPa, 20 s. HCB: 20 mmol/L phosphate (pH 2.2). Peak and concentration of standard solution: 1. Benzo[g, h, i]perylene 4.38 mg/L; 2. Dibenz[a, h]anthracene 7.5 mg/L; 3. Benzo[a]pyrene 8.75 mg/L; 4. Benzo[b]fluoranthene 5 mg/L; 5. Benz[a]anthracene 5 mg/L; 6. Fluoranthene 2.5 mg/L

3.5 方法学考察

图4为6种PAHs的标准品的正向MEEKC电泳谱图,图3B为标准品的LVSS-DypH-sweep电泳谱

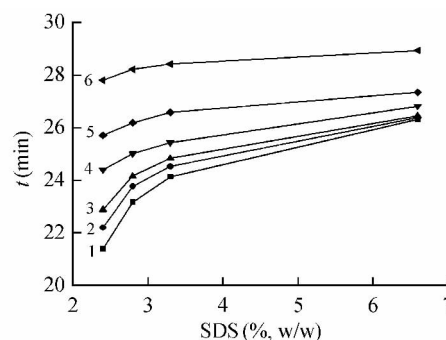


图2 SDS浓度对分离时间的影响

Fig.2 Effect of the concentration of SDS on the migration time

1. Fluoranthene; 2. Benz[a]anthracene; 3. Benzo[b]fluoranthene; 4. Benzo[a]pyrene; 5. Dibenz[a,h]anthracene; 6. Benzo[g,h,i]perylene.

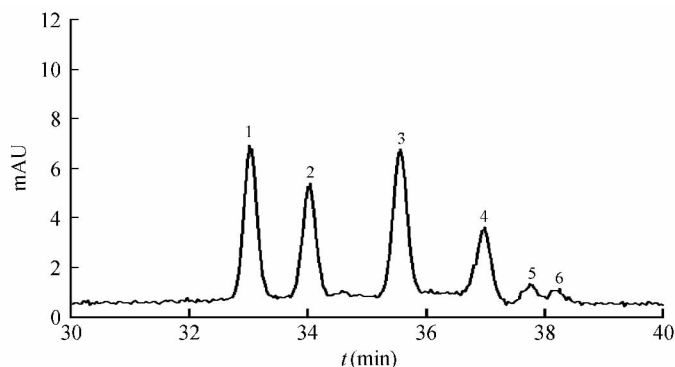


图 4 6 种 PAHs 的正向电动色谱图

Fig. 4 Electropherograms of six polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixed standard solution

峰编号及标准溶液浓度: 1. 荧蒹 25 mg/L; 2. 苯并(a)蒹 25 mg/L; 3. 苯并(b)荧蒹 25 mg/L; 4. 苯并(a)芘 87.5 mg/L; 5. 二苯并(a,h)蒹 37.5 mg/L; 6. 苯并(g,h,i)芘 43.8 mg/L。运行缓冲液: 1.8% (w/w) SDS-0.4% 正己烷(w/w)-20% 正丁醇(V/V)-22% 乙腈(V/V)-5 mmol/L 硼砂(pH 9.24); 进样: 6 s/3 kPa。

Peak and concentration of standard solution: 1. fluoranthene 25 mg/L, 2. benz[a]anthracene 25 mg/L, 3. benzo[b]fluoranthene 25 mg/L, 4. benzo[a]pyrene 87.5 mg/L, 5. dibenz[a,h]anthracene 37.5 mg/L, 6. benzo[g,h,i]perylene 43.8 mg/L; Microemulsion buffer solutions: 1.8% (w/w) SDS-0.4% n-hexane(w/w)-20% n-butyl alcohol(V/V)-22% acetonitrile(V/V)-5 mmol/L sodium borax buffer(pH 9.24); Pressure injection of sample: 6 s/3 kPa.

图。表明利用反向 MEEKC 法分离 6 种物质, 分析时间变短、分离度增加, 采用联用方式富集后的灵敏度明显提高。配制 6 种 PAHs 系列标准溶液, 在最优化条件下进行分离分析, 以峰面积(y)对样品浓度(x, mg/L)进行线性回归, 以 3 倍信噪比(S/N=3)计算出 6 种分析物的检出限(LOD), 见表 1。

表 1 6 种 PAHs 的回归方程、线性范围和检出限

Table 1 Linearity, regression equation, LODs of PAHs by LVSS-DypH-sweep MEEKC

分析物 Analyte	线性范围 Linear range (mg/L)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	检出限 LOD (mg/L)	相对标准偏差 RSD (%, $n=5$)	富集倍数 Enrichment
荧蒹 Fluoranthene	50 ~ 4000	$y = 28.6x - 105$	0.998	38	4.9	50
苯并(a)蒹 Benz[a]anthracene	15 ~ 150	$y = 122x - 67$	0.999	8.8	3.7	80
苯并(b)荧蒹 Benzo[b]fluoranthene	100 ~ 10000	$y = 15.4x + 114$	0.998	58	4.7	40
苯并(a)芘 Benzo[a]pyrene	50 ~ 4000	$y = 51.4x - 213$	0.999	24	5.1	55
二苯并(a,h)蒹 Dibenz[a,h]anthracene	100 ~ 10000	$y = 12.8x - 78$	0.999	84	3.6	25
苯并(g,h,i)芘 Benzo[g,h,i]perylene	88 ~ 70000	$y = 25.4x - 233$	0.9991	49	4.4	70

富集倍数: 稀释倍数×LVSS-DypH-sweep 的峰面积/正相 MEEKC 的峰面积。

Enrichment factor: (Peak area of LVSS-DypH-sweep × dilution factor) / peak area of MEEKC.

3.6 样品测定和回收率实验

选择了洗面奶、爽肤水、乳液、润肤霜、沐浴露、粉底液、洗发水、护发素等 9 种不同形态的市售及美容院专用化妆品, 每种选择 4 个品牌, 在优化条件下同时检测上述 6 种 PAHs, 均未检出分析物。考虑到样品基质对富集效果的影响, 将样品溶液用二氯甲烷和微乳缓冲液稀释 20 倍后进行分析。将提取后的样品平行取 2 份, 其中 1 份测定其本底值, 另 1 份添加一定质量浓度的混合标准溶液, 做回收实验, 图 5 是某品牌化妆品乳液加标后的毛细管电泳富集谱图。重复 5 次的测定结果如表 2 所示。由结果可知, 6 种物质的回收率均在 90.6% ~ 95.9% 之间, 其 RSD 均小于 5.1%。

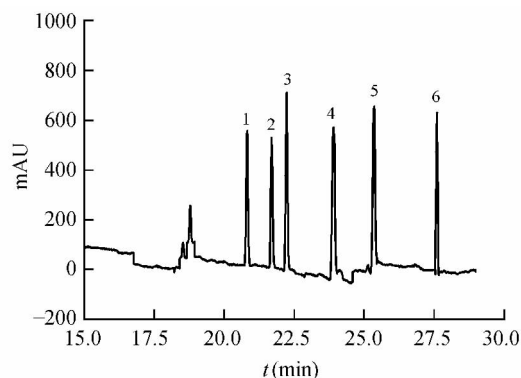


图 5 实际样品的加标回收 LVSS-DypH-sweep 电泳谱图

Fig. 5 Electropherogram of real sample solution by LVSS-DypH-sweep MEEKC

所有测量条件和峰号同图 3B

All conditions and peak numbers were the same as in Fig. 3B.

表 2 回收率实验

Table 2 Results of recovery test

分析物 Analyte	添加量 Added (mg/L)	测量值 Found (mg/L)	回收率 Recoveries (%)	相对标准偏差 RSD (% , n = 5)
荧蒽 Fluoranthene	1.25	1.19	95.1	4.7
苯并(a) 蒽 Benz[a]anthracene	2.5	2.34	93.7	4.9
苯并(b) 荧蒽 Benzo[b]fluoranthene	2.5	2.26	90.6	3.8
苯并(a) 芘 Benzo[a]pyrene	4.5	4.1	91.3	5.1
二苯并(a , h) 蒽 Dibenzo[a , h]anthracene	3.8	3.64	95.9	3.3
苯并(g , h , i) 芘 Benzo[g , h , i]perylene	2.5	2.27	90.8	3.7

References

- 1 Hygienic Standard for Losmetics. Ministry of Health , People's Republic of China. Beijing ,2007: 16
化妆品卫生规范. 北京: 中华人民共和国卫生部 ,2007: 16
- 2 Demirci A. Polycyclic Aromatic Compounds ,2014 ,34(2) : 115 – 134
- 3 MO Li-Gui , MA Sheng-Tao , LI Hui-Ru , YU Zhi-Qiang , SHENG Guo-Ying , FU Jia-Mo. Chinese J. Anal. Chem. ,2013 , 41(12) : 1825 – 1830
莫李桂,马盛韬,李会茹,于志强,盛国英,傅家谟. 分析化学, 2013 ,41(12) : 1825 – 183
- 4 Oluseyi T O , Olayinka K O , Adedapo E A. J. Chem. Soc. Nigeria. ,2013 ,38(2) : 43 – 47
- 5 YIN Yi , ZHENG Guang-Ming , ZHU Xin-Ping , MA Li-Sha , WU Shi-Hui , PAN De-Bo , Dai Xiao-Xin , XIE Wen-Ping. Journal of Instrumental Analysis ,2011 ,30(10) : 1107 – 1112
尹 怡,郑光明,朱新平,马丽莎,吴仕辉,潘德博,戴晓欣,谢文平. 分析测试学报, 2011 ,30(10) : 1107 – 1112
- 6 WANG Li , JIN Fen , LI Min-Jie , LIU Yue. Chinese J. Anal. Chem. ,2013 ,41(6) : 869 – 875
王 丽,金 芬,李敏洁,刘 玥. 分析化学, 2013 ,41(6) : 869 – 875
- 7 Sun J , Qiao B , Sun D. Advanced Materials Research (Durnten-Zurich Switzerland) ,2014: 838 – 841
- 8 Rosario P M A , Nogueira J M F. Electrophoresis ,2006 ,27(23) : 4694 – 4702
- 9 Alzola R , Pons B , Bravo D. Environ. Technol. ,2008 ,29(11) : 1219 – 1228
- 10 Qu Q S , Wang S , Mangelings D. Electrophoresis ,2009 ,30(6) : 1071 – 1076
- 11 Chen J , Sun J Z , Liu S H. Anal. Lett. ,2013 ,46(6) : 887 – 899
- 12 Kukusamude C , Srijaranai S , Quirin J P. Electrophoresis ,2014 ,35(10) : 1478-1483
- 13 Quirino J P , Terabe S. Science ,1998 ,282 (5388) : 465 – 468
- 14 Palmer J , Burgi D S , Munro N J , Landers J P. Anal. Chem. ,2001 ,73 (4) : 725 – 731
- 15 Britz-mckbbin P , Wong J , Chen D D Y. J. Chromatogr. A ,1999 ,853 (1-2) : 535 – 540
- 16 Morales S , Cela , R. J. Chromatogr. A ,1999 ,846 (1-2) : 401 – 411
- 17 Yu L , Li S F. Electrophoresis ,2005 ,26(22) : 4360 – 4367

