

## 尿中芘、苯并(k)萤蒽和 苯并(a)芘的鉴别与测定

赵振华 全文熠 田德海

宋延均

(北京市环境保护科学研究所)

(北京医科大学卫生系)

### 摘 要

本文用高压液相色谱结合荧光分光光度技术定性鉴别了尿样中芘、苯并(k)萤蒽和苯并(a)芘的存在,并用标样进行了定量测定的研究。芘、苯并(k)萤蒽和苯并(a)芘在尿样中的回收率分别为60%、90%和80%;标准偏差为4.7%、17%和10%;检测限为0.77ng、0.05ng和0.06ng。对吸烟者尿中这三种多环芳烃进行了定量测定,结果为芘53.3ng、苯并(k)萤蒽3.7ng、苯并(a)芘4.7ng;而对照组的尿样中,苯并(k)萤蒽和苯并(a)芘的含量均在检测限以下。

多环芳烃类化合物是环境中广泛存在的一类有致癌作用的污染物<sup>[1]</sup>,在吸烟者和焦炉工的尿样中均存在苯并(a)芘<sup>[2]</sup>,这说明接触PAH化合物的人尿中含有原型PAH化合物。本文用高压液相色谱结合荧光光度技术确证了接触PAH化合物的人尿中,有原型芘、苯并(k)萤蒽和苯并(a)芘存在,对吸烟者和焦炉工尿样中这三种化合物进行了定量分析。

### 实 验 部 分

#### 1. 仪器与试剂

日立638-50型高压液相色谱仪,UV-254检测器,650-10型荧光检测器,MPF-4型荧光分光光度计。

芘、BaP为Koch-light laboratories Ltd.产品;BkF为西德进口分装;甲醇、环己烷为分析纯,用前重蒸;聚氨基甲酸乙酯泡沫(d. 0.043g/cm)。

#### 2. 尿样预处理

受试者均为男性,年龄为 $50 \pm 5$ 岁,收集上午8时至下午5时的全部尿样。吸烟组在此期间每人吸20支带过滤嘴的“大重九”香烟;对照组为在不吸烟场所的受试者;焦炉工的尿样采自T焦化厂。

尿样的预处理按文献(2)的方法进行。先将尿样预热至 $75 \pm 5^\circ\text{C}$ ,再以 $60 \pm 10\text{ml/min}$ 的速度通过装有聚氨酯泡沫的玻璃柱,使样品中的PAH吸附在泡沫上,然后用环己烷提取。提取液经浓缩定容至0.2ml,进行HPLC分析。

### 3. 反相HPLC分析

分别采用 Perkin Element 的 HC-ODS Silx-1 反相柱 ( $0.26 \times 25\text{cm}$ ) 和 Varian 的 Micropak-MCH5 反相柱 ( $0.4 \times 15\text{cm}$ ), 根据测定目的选择不同的流动相条件进行测定。

**BaP 醇型代谢产物的测定** 流动相 B 为甲醇: 水: 磷酸 = 60: 40: 0.1, 流动相 C 为甲醇: 水: 磷酸 = 85: 15: 0.1。梯度洗脱, 程序开始时 B 为 100%, 至 40 min 时变成 C 100%, 再保持 15 min。流量为 1 ml/min。

**BkF 和 BaP 的测定** 流动相为甲醇: 水 = 90: 10, 流量为 1 ml/min。

**尿中芘、BkF 和 BaP 的定量测定** 流动相 A 为甲醇: 水 = 80: 20; 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱, 程序开始时 A 为 100%, 至 10 min 时, 改变成 B 为 100%, 再保持 10 min。流量 1 ml/min。根据峰高用单点外标法进行定量。

### 4. 纸层析-荧光分析

使用乙酰化层析滤纸 (结合酸 19.0—19.8%), 展开剂为 甲醇: 乙醚: 水 = 4: 4: 1。用毛细管点样后置暗室展开 16 h, 然后在紫外灯下根据标样的标准点划出样品中的待测点, 剪下待测斑点用甲醇洗脱, 进行荧光光谱的测定。

### 5. 烟焦油中 BaP 的分析<sup>[4]</sup>

按照标准方法<sup>[4]</sup> 制取“大重九”香烟的烟焦油, 然后在索氏提取器中用环己烷提取, 提取液浓缩后用硅胶柱层析净化, 经 HPLC-荧光检测器进行定量测定。

## 结 果 与 讨 论

### 1. 尿样中三种原型多环芳烃的鉴别

芘和 BkF 在城市大气、焦炉作业区和香烟烟焦油中多环芳烃化合物相对含量都比较高, 而 BaP 作为致癌性 PAH 化合物的代表, 已被广泛接受为 PAH 的指示化合物。人体受到 PAH 污染, 在排出的尿中有可能存在这三种化合物的代谢产物及其原型化合物。我们选用不同的方法分别对它们进行了定性鉴定。

#### 1.1 芘、BkF 和 BaP 的色谱定性的鉴别

使用两种反相色谱柱, 用检测器特异的荧光激发波长和发射波长, 分别在不同的三种洗脱条件下, 用与标样有相同保留时间的方法进行测定 (见图 1、2、3)。结果表明, 吸烟者的尿样中有和芘、BkF、BaP 相同保留时间的色谱峰而且这些色谱峰在该化合物特异的激发波长和发射波长内表现出高的灵敏度。因此, 可以初步肯定被测样中有芘、BkF 和 BaP 存在。

#### 1.2 样品待测组份的荧光光谱鉴别

为了进一步对所测化合物进行定性鉴定, 收集 HPLC 的待测色谱峰的流出部份, 进行荧光光谱测定。图 4 为相当于芘的色谱峰流出液的测定结果, 与芘的标准样品所测得的荧光激发光谱与反射光谱相似, 证明待测样品中确有芘的存在。

在 BkF 和 BaP 的测定中, 由于这两个化合物的色谱保留时间相距甚近, 又是痕量, 无法分别获集其 HPLC 的流出液, 为此, 先将 BkF 和 BaP 的色谱流出液收集在一起, 再用

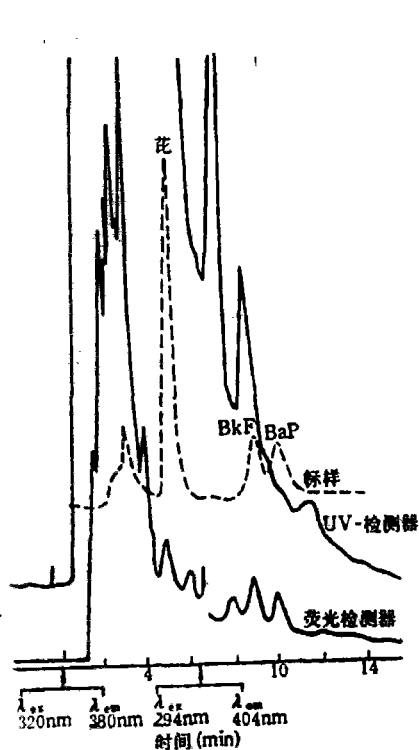


图1 焦炉工尿样的HPLC图  
Silx-1反相柱, 甲醇:水=60:1, 流量1ml/min

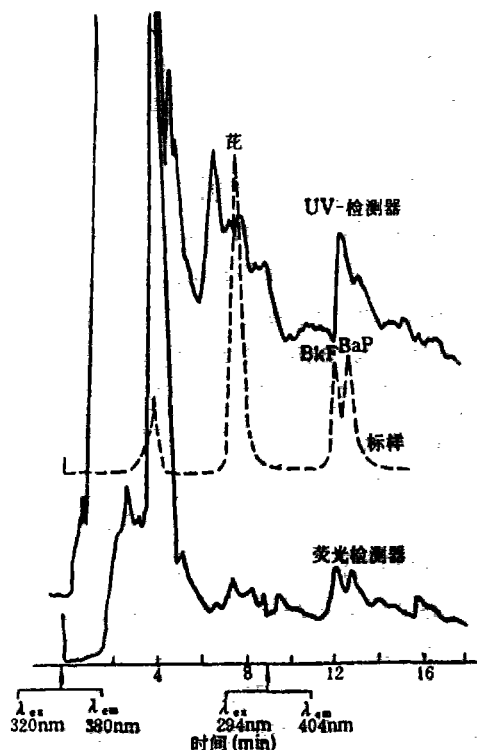


图3 吸烟者尿样的HPLC图  
Micropak-MCH-5反相柱, 进样量30 $\mu$ l

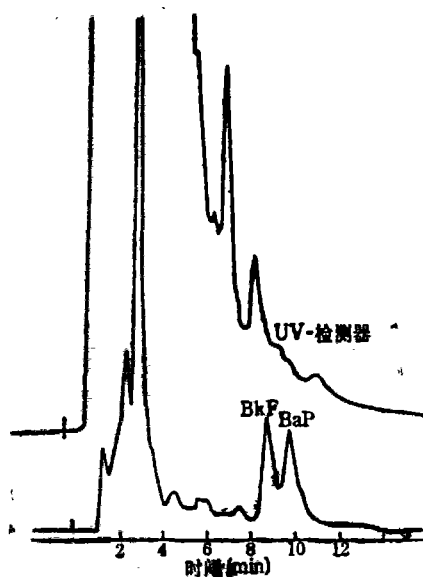


图2 焦炉工尿样中加入BkF和BaP的HPLC图  
条件同图1, 进样量10 $\mu$ l

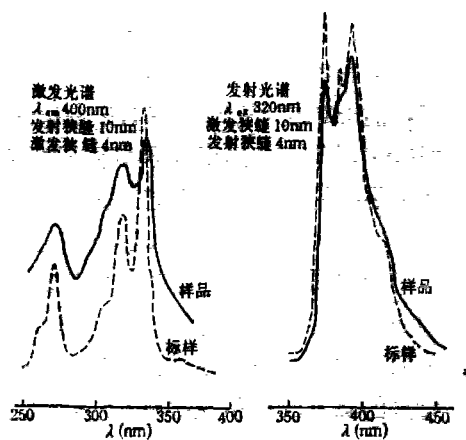


图4 样品中花的荧光光谱

纸层析法分离, 然后分别测定其荧光光谱(图5和图6)。这些谱图均与各自标样的谱图相同, 表明样品中与BkF和BaP有相同保留时间的色谱峰确为BkF

和BaP。

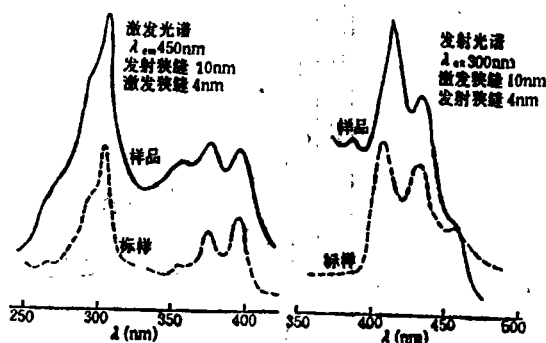


图5 样品中BkF的荧光光谱

## 2. BaP代谢产物的测定

采用对BaP代谢产物有良好分离效果的色谱条件<sup>[5]</sup>, 对10名焦炉工和10名吸烟者的尿样进行分析, 均未测出有3-羟基苯并(a) 芘和9-羟基苯并(a) 芘的存在。

图7 为一个焦炉工尿样的色谱图, 由图可以看出, 采用甲醇、水和磷酸混合液的梯度洗脱条件, 可将BaP的几个主要代谢产物得到很好的分离, 而在样品中未测出这些化合物。10名焦炉工和10名吸烟者的色谱图都很相似, 表明尿中无游离的BaP代谢产物存在, 可能以某种结合形式(如葡萄糖酸苷酯)存在, 这需要对尿样进行水解处理后才有可能证实<sup>[6]</sup>。

在测定代谢产物的色谱条件下, 由于保留时间过长, BkF与BaP分离不好, 因而这一色谱条件不适于原型BkF和BaP的测定。

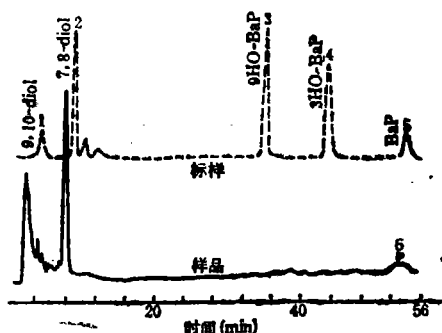


图7 焦炉工尿样的HPLC图

荧光检测器:  $\lambda_{\text{ex}}$  338nm,  $\lambda_{\text{em}}$  425nm

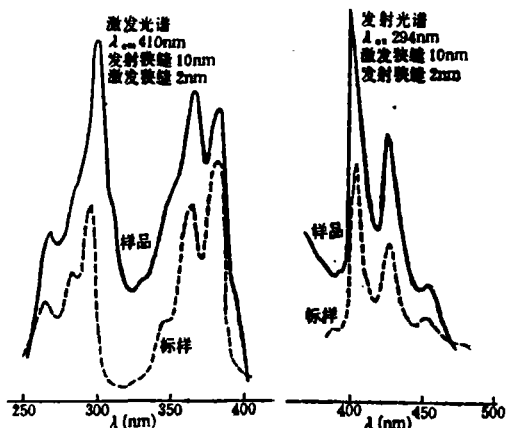


图6 样品中BaP的荧光光谱

## 3. 尿样中芘、BkF与BaP的定量测定

### 3.1 检测限与回收率

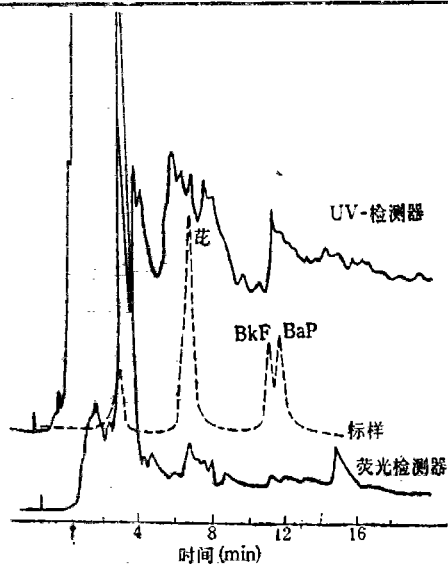
应用HPLC-荧光检测器, 在甲醇与水梯度洗脱条件下, 芘、BkF和BaP的检测限分别为0.77ng、0.05ng、0.06ng。在100ml尿样中加入标准样品芘1.72μg、BkF 16ng、BaP 20ng, 进行八次回收实验, 每个样品做2次, 取其平均值进行计算, 结果列于表1。

### 3.2 对照组的测定结果

曾用薄层-荧光测定了27名不吸烟的非职业性人群八小时的尿样, 均未检出BaP<sup>[2]</sup>。本实验又对7名不吸烟人群的尿

表1 三种PAH化合物在尿样中的回收率

| 化合物       | BaP(%) | BkF(%) | 芘(%) |
|-----------|--------|--------|------|
| n         |        |        |      |
| 1         | 81.4   | 83.3   | 61.7 |
| 2         | 80.6   | 80.4   | 58.2 |
| 3         | 81.8   | 72.2   | 58.4 |
| 4         | 77.1   | 119    | 67.5 |
| 5         | 69.6   | 110    | 60.3 |
| 6         | 95.5   | 91.8   | 61.3 |
| 7         | 84.8   | 84.9   | 60.0 |
| 8         | 74.0   | 93.0   | 61.1 |
| $\bar{X}$ | 81.5   | 91.8   | 61.1 |
| $S_x$     | 8.3    | 15.6   | 2.9  |
| CV%       | 10     | 17     | 4.7  |

图9 另一名对照者尿样的HPLC图  
(色谱条件同图3)

样进行对照实验,结果表明,八小时尿中的BaP与BkF均在检测限以下;有三例尿样中检出了痕量芘,其余均在检测限以下。图8为一名不吸烟者,图9为另一名对照者尿样的色谱图。

### 3.3 吸烟组的测定结果

在对比、BkF和BaP定性鉴定的基础上,定量测定了这三种化合物在吸烟者尿样中的含量,表2给出了21人次的测定结果。结果表明,尽管每个受试者在八小时内吸了同量的烟,但三次测定结果并不一致,有的差别还比较大。这可能是由于受试者吸烟的场所、方式不完全

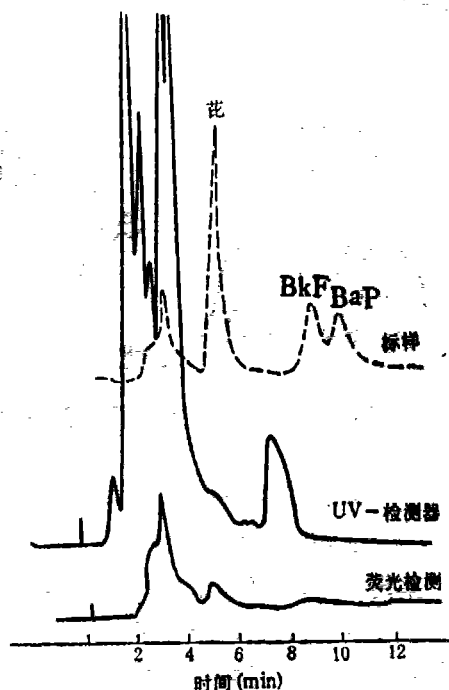
图8 一名不吸烟者尿样的HPLC图  
(色谱条件同图1)

表2 吸烟者尿样中三种PAH化合物的含量 (ng)

| 受试者       | 测定次数<br>n | 八小时尿样中PAH含量 (ng) |      |      |
|-----------|-----------|------------------|------|------|
|           |           | 芘                | BkF  | BaP  |
| 朱         | 1         | 16.0             | 1.5  | 1.6  |
|           | 2         | 29.6             | 15.9 | 20.7 |
|           | 3         | 34.8             | 5.8  | 6.4  |
| 高         | 1         | 17.5             | 2.6  | 2.5  |
|           | 2         | 28.7             | 1.7  | 1.7  |
|           | 3         | 38.3             | 2.2  | 2.1  |
| 许         | 1         | 15.4             | 1.4  | 1.5  |
|           | 2         | 62.9             | 3.0  | 2.5  |
|           | 3         | 69.4             | 1.3  | 1.2  |
| 李         | 1         | 31.4             | 10.6 | 13.2 |
|           | 2         | 28.4             | 12.8 | 16.7 |
|           | 3         | 39.7             | 1.2  | 1.2  |
| 吴         | 1         | 83.7             | 6.2  | 7.8  |
|           | 2         | 32.4             | 1.6  | 1.4  |
|           | 3         | 29.8             | 2.9  | 3.3  |
| 牛         | 1         | 50.7             | 4.6  | 5.8  |
|           | 2         | 22.9             | 2.5  | 2.9  |
|           | 3         | 26.7             | 1.5  | 1.0  |
| 徐         | 1         | 24.6             | 1.1  |      |
|           | 1         | 44.1             | 2.9  | 2.9  |
|           | 1         | 29.4             | 3.2  | 3.9  |
| 史         | 最大值       | 83.7             | 15.9 | 20.7 |
|           | 最小值       | 15.4             | 1.1  | 1.0  |
| $\bar{X}$ | $\bar{X}$ | 35.3             | 3.7  | 4.7  |

相同,也不能排除饮食和其它方面的影响。但总的看来,还是有一定的规律性:绝大多数样品中BaP和BkF的含量在5ng以下,只有两个样品高于10ng;芘的浓度变化比较大,大部分样品中芘的含量在20—40ng之间,三种化合物测定结果的算术平均值为: BaP4.7ng、BkF3.7ng、芘35.3ng。

对四名焦炉工八小时内的尿样测定结果的平均值为: 芘110.8ng、BkF9.7ng、BaP 10.4ng。他们吸烟的数量均为20支大重九牌香烟,尿样中三种 PAH 的含量均为吸烟者尿样中的三倍左右。

为了对吸烟者尿中排出BaP的量与其吸入量的关系进行估算,对受试者所吸香烟烟雾中的BaP进行了实测。每次用一条烟的烟焦油进行测定,共测三次,结果为1.90、1.55和1.17 $\mu$ g/100支烟,平均为1.87 $\mu$ g/100支烟。假定受试者八小时实际吸收(20支香烟)到体内的BaP量为50%(即10支烟内BaP的量187ng),用尿中排出的BaP平均值计,尿中排出的BaP量为其吸收量的2.5%。如果烟焦油中所含BaP全部被吸烟者吸收,则尿中的排出量仅为吸入量的1.25%。

文献报道<sup>[7]</sup>,每天吸20支烟的人吸入BaP的量为400ng,若以此值计算,则尿中BaP的含量应为吸入量的1.2%;芘在烟焦油中的含量为16.2 $\mu$ g/100支烟,20支烟中含有3240ng,吸烟者吸入量如仍按50%(1620ng)计,根据我们对尿中的实测值(35.3 ng)计算,尿中的排出量应为吸入量的2.2%,与BaP的排出率相同。

上述估算表明,尿中排出的原型多环芳烃化合物仅占吸入量的很小部份,但吸烟者及焦炉工尿中的这些PAH化合物均明显高于对照组的水平,这在一定程度上反映了人体接触PAH的情况。

#### 参 考 文 献

- [1] IARC Monographs, 1983. Polynuclear Aromatic Compounds, Part I. Chemical Environmental and Experimental Data, Vol. 32, IARC, Lyon, France
- [2] 宋延均等, 1983. 尿样中苯并(a) 芘测定方法. 中华预防医学杂志, 17(6): 357—359
- [3] 全文熠, 赵振华, 1986. 香烟烟气冷凝物中苯并(a) 芘和苯并(k) 荧蒽的灵敏和快速测定. 环境科学丛刊, 7(8): 6—9
- [4] ISO-3308-77
- [5] 赵振华, 全文熠, 1986. 用高压液相色谱结合荧光分光光度技术分析苯并(a) 芘的代谢产物. 环境科学丛刊, 增刊: 101
- [6] Jongeneelen et al., 1985. Excretion of 3-Hydroxy-benzo(a)pyrene and Mutagenicity in Rat Urine after Exposure to Benzo(a)pyrene. *J. Appl. Toxicol.*, 5:277—282
- [7] Bridgford K. et al., 1976. Human Exposure to Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. In *Carcinogenesis*, vol. 1, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry Metabolism and carcinogenesis edited by Freudenthal R and Jones P W, Raven Press, New York, 253—270
- [8] Severson R F et al., 1976. Isolation Identification and Quantitation of the Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Tobacco Smoke. In *Carcinogenesis*, Vol. 1, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Metabolism and Carcinogenesis, edited by Freudenthal R and Jones P W, Raven Press, New York, 319—324

1987年3月30日收到。

## IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF PYRENE, BENZO(k)FLUORANTHENE AND BENZO(a)PYRENE IN URINE OF SMOKERS

Zhao Zhenhua      Quan Wenyi      Tian Dehai

(Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection)

Song Yanjun

(Beijing Medical University)

### ABSTRACT

Pyrene, Benzo(k)fluoranthene(BkF) and Benzo(a)pyrene (BaP) in urine of smokers and coke oven workers were identified by high pressure liquid chromatography coupled with fluorescence spectroscopy. The methodology for quantitative analysis of the three polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in urine has been developed to improve the sensitivity. The minimum detection limits found for pyrene, BkF and BaP were 0.77ng, 0.05ng and 0.06ng, respectively. The average recovery and relative standard deviation were found to be 60% and 4.7% for pyrene, 90% and 17% for BkF, and 80% and 10% for BaP. The amounts of the three PAHs in urine samples of smokers were determined to be 53.3ng for pyrene, 3.7ng for BkF and 4.7ng for BaP. It is estimated that the content of BaP in urine of smokers amounts to about 2.5% of the total amount of BaP in cigarette smoke inhaled.