

高效液相色谱法测定土壤中的多环芳烃*

Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil by High Performance Liquid Chromatography

杜寒春, 徐慧, 黄岛平, 陈建红, 蒋艳芳

DU Han-chun, XU Hui, HUANG Dao-ping, CHEN Jian-hong, JIANG Yan-fang

(广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022)

(Guangxi Research Center of Analysis and Testing, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要:采用高效液相色谱-荧光检测器快速测定土壤中15种多环芳烃。通过对液相色谱柱、梯度洗脱程序、检测波长程序及柱温等液相色谱条件的选择和优化,使土壤样品中15种多环芳烃在32min内得到完全分离,方法的最低检出限为0.0002~0.0045 mg/kg,回收率为71.20%~95.07%,RSD为5%~10%。该优化方法的精密度高、检出限低、重复性好,是一种能够快速、准确测定土壤中多环芳烃的检测方法。

关键词:高效液相色谱法 多环芳烃 土壤

中图分类号:O657.72 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2010)03-0245-03

Abstract: Fluorescence detection-high performance liquid chromatographic method was applied to rapidly determine 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. The method realized the complete separation of 15 PAHs in 32min by selecting and optimizing the chromatographic conditions, including liquid chromatography column, the gradient elution procedure, the detection wavelength program and the column temperature. The detection limits and the recoveries of the improved method for the 15 PAHs were in the ranges of 0.0002mg/kg to 0.0045mg/kg and 71.20% to 95.07%, respectively. The relative standard deviations (RSD) of this method were in the range of 5% to 10%. The results indicated that this method is a rapid and accurate method with high precision, low detection limit and good reproducibility for the determination of PAHs in soil.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), soil

多环芳烃(PAHs)是一组稠环芳香化合物,主要是由于有机物(如煤、石油和木材等)在高温下不完全燃烧产生的^[1~3]。PAHs广泛存在于大气、水、土壤和植物等自然环境中^[4,5]。其中萘、苊等16种PAHs因具有致癌、致畸及致突变性而被美国环境保护局(EPA)列入优先控制和监测的有毒有机污染物黑名单中^[6,7]。在全国土壤污染状况调查中,国家环境保护总局也把16种PAHs作为检测对象^[8]。

目前,分离和测定PAHs的主要方法有气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)和高效液相色谱法(HPLC)等^[9~12]。国家环境保护总局采用EPA推荐的高效液相色谱法(HPLC)测定土壤中的PAHs^[8]。文献^[13]研究发现EPA推荐的HPLC色谱柱的分析灵敏度不高,而且荧光检测器的检测波长程序不理想,致使PAHs的检出限过高,达不到全国土壤污染状况调查质量控制要求。本文对HPLC法的一系列色谱条件进行选择 and 优化,在32min内都得到15种PAHs(因苊烯的荧光反应较弱而未计入)的良好分离,分析结果满足全国土壤污染状况调查质量控制要求。

收稿日期:2010-06-20

作者简介:杜寒春(1980-),女,硕士,工程师,主要从事化学分析工作。

*广西科技基础条件平台建设项目(合同编号:08-05-01D)资助。

1 实验部分

1.1 仪器

高效液相色谱仪 Waters2695, 荧光检测器 Waters2475. Agilent PAHs 柱: S-5 μ m, 250mm \times 4.6mm. Waters XterraTM RP18 色谱柱: S-5 μ m, 250mm \times 4.6mm. 振荡器(上海跃进医疗器械厂生产). 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂生产). 氮吹仪(北京莱博科技有限公司出品). K 氏离心管. 注射器过滤器(津腾); 孔径为 0.45 μ m.

1.2 试剂

分析纯硅胶、二氯甲烷、无水硫酸钠, HPLC 级乙腈. 所有试剂均作空白实验, 符合质量控制要求方可使用. 水为 Milli-Q 超纯水(美国 Millipore 公司出品).

Supelco 16 种 PAHs 混合标准液, 各组分的浓度分别为: 萘 992 μ g/ml、萘 997 μ g/ml、芴 199.9 μ g/ml、菲 92.3 μ g/ml、蒽 100.9 μ g/ml、荧蒽 198.6 μ g/ml、芘 101.6 μ g/ml、苯并[a]蒽 100 μ g/ml、屈 100.3 μ g/ml、苯并[b]荧蒽 194.3 μ g/ml、苯并[k]荧蒽 100 μ g/ml、苯并[a]芘 101.8 μ g/ml、二苯并[a,h]蒽 203.8 μ g/ml、苯并[g,h,i]芘 199.3 μ g/ml、茚并[1,2,3-cd]芘 100.3 μ g/ml.

1.3 样品处理

1.3.1 提取

称取 10g 土壤样品于三角瓶中, 加 3g 硅胶(使用前于 130 $^{\circ}$ C 活化 16h 以上), 再加入 100ml 二氯甲烷(使用前需重蒸), 于振荡器上振荡 30min.

于杯形漏斗中倒入少量无水硫酸钠(使用前于 400 $^{\circ}$ C 加热纯化 4h 以上), 分次倒入样液脱水. 样液转移完后, 用 50ml 二氯甲烷分 3 次冲洗无水硫酸钠, 样液和洗液一同收集于干净的平底烧瓶里.

1.3.2 浓缩及试剂转换

设置水浴锅的水温不超过 45 $^{\circ}$ C, 将洗脱液于旋转蒸发器上浓缩至约 5ml. 用 4ml 乙腈清洗平底烧瓶并转移样品至 10ml \cdot K 氏离心管内, 于氮仪上吹去二氯甲烷至样液体积为 4ml, 过 0.45 μ m 的有机滤膜, 收集滤液于 1.5ml 样品瓶内, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存供 HPLC 分析用.

1.4 液相色谱检测条件优化

1.4.1 色谱柱优化

选取 Waters 色谱柱和 Agilent 的多环芳烃专用色谱柱进行对比实验. 实验的流动相为乙腈和水, 柱温 23 $^{\circ}$ C, 流速 0.6ml/min, 进样量 20 μ l. 由所得的液

相色谱图(图 1)可以看出, 多环芳烃专用色谱柱的分离效果明显好于 Waters 色谱柱. 采用 Agilent 多环芳烃专用色谱柱, 可以得到较佳的 15 种多环芳烃组分分离效果.

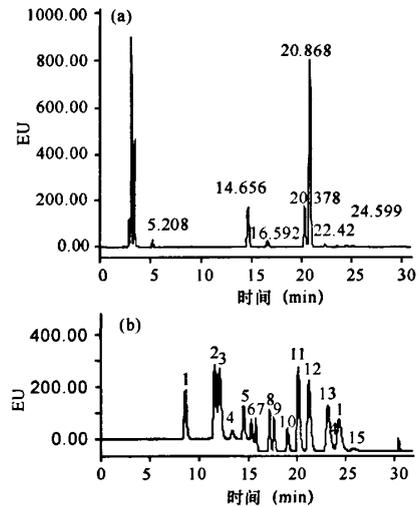


图 1 Waters XterraTM RP18 柱(a)和 Agilent PAHs 柱(b)荧光检测 15 种 PAHs 标准溶液液相色谱

1. 萘(naphthalene); 2. 萘(acenaphthene); 3. 芴(flourene); 4. 菲(phenanthrene); 5. 蒽(anthracene); 6. 荧蒽(flouanthene); 7. 芘(pyrene); 8. 苯并[a]蒽(Benzo[a]anthracene); 9. 屈(chrysene); 10. 苯并[b]荧蒽(benzo[b]fluoranthene); 11. 苯并[k]荧蒽(benzo[k]fluoranthene); 12. 苯并[a]芘(benzo[a]pyrene); 13. 二苯并[a,h]蒽(dibenzo[a,h]acenaphthene); 14. 苯并[g,h,i]芘(benzo[g,h,i]perylene); 15. 茚并[1,2,3-cd]芘(indeno[1,2,3-cd]pyrene).

1.4.2 荧光检测器条件优化

梯度洗脱可提高分离度、缩短分离时间, 提高分离精度, 为了使 15 种多环芳烃组分能够在较短时间内得到比较理想的分离效果, 实验采用二元梯度洗脱法, 柱温 23 $^{\circ}$ C, 流速 0.6ml/min, 进样量 20 μ l, 通过不断调节流动相乙腈和水的比例, 最终优化得到一个较佳的梯度洗脱程序(表 1), 此条件下各组分均得到了很好的分离.

同时, 实验对 15 种多环芳烃组分的激发波长和发射波长进行了比较和筛选, 根据其荧光响应值的高低, 优化出最佳的检测波长程序(表 2), 实现了各组分的高灵敏度、低检出限.

实验过程中还发现柱温对多环芳烃各组分的保留时间和分离度有很大影响, 经过反复实验、比较, 最终确定, 当柱温为 23 $^{\circ}$ C 时, 各组分在 32min 内的分离效果最好.

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	乙腈(%)	水(%)
0	50	50
10	70	30
13	100	0
27	100	100
28	50	50
32	50	50

表 2 多环芳烃的检测波长程序

时间(min)	激发波长 λ_{Ex} (nm)	发射波长 λ_{Em} (nm)
0	270	323
11.8	252	370
12.5	252	402
14.0	280	460
15.5	270	390
18.5	290	410
25.4	290	500

2 方法的线性关系、检出限及精密度

在优化的色谱条件下,对系列浓度的 PAHs 混合标准溶液进行测定,以峰面积和各组分的质量浓度作图,得到各组分的回归方程和相关系数见表 3。表 3 结果表明 PAHs 各组分线性关系良好,15 种 PAHs 组分的检出限(以信噪比 S/N=3 计)范围为 0.0002~0.0045mg/kg,完全满足环境样品中痕量 PAHs 的检测分析要求。对混合标准溶液平行测定 6 次,测定值的 RSD 为 0.5%~1.0%,表明方法的精密度高。

表 3 本方法的线性方程和检出限

组分	相关系数	回归曲线方程*	LOD (mg/kg)
萘	0.9995	$y = 339.66x + 64.299$	0.0031
芴	0.9993	$y = 373.96x + 81.501$	0.0018
苊	0.9989	$y = 1720.6x + 90.231$	0.0006
菲	0.9985	$y = 614.38x + 34.369$	0.0020
蒽	0.9992	$y = 1832.2x + 68.482$	0.0020
荧蒽	0.9990	$y = 498.76x + 29.962$	0.0011
苝	0.9984	$y = 1136.0x - 32.590$	0.0028
苯并[a]蒽	0.9993	$y = 1859.9x + 65.589$	0.0005
屈	0.9998	$y = 1637.7x + 57.297$	0.0006
苯并[b]荧蒽	0.9993	$y = 769.35x + 47.43$	0.0006
苯并[k]荧蒽	0.9988	$y = 6395.3x + 250.53$	0.0002
苯并[a]芘	0.9993	$y = 6064.5x + 227.32$	0.0002
二苯并[a,h]蒽	0.9993	$y = 2395.3x + 166.14$	0.0004
苯并[g,h,i]芘	0.9993	$y = 2014.6x + 102.19$	0.0028
茚并[1,2,3-c,d]芘	0.9991	$y = 376.72x - 19.725$	0.0009

* y 为峰面积, x 为含量($\mu\text{g/ml}$)。

3 土壤样品测定

运用本方法对来自不同取样区的 5 个土壤样品(R536、R613、R627、R637、R825)分别进行样品处理及 HPLC 测定,采用外标法进行定量,分析结果见表 4。

表 4 土壤样品中 PAHs 的分析结果

组分	含量(mg/kg)				
	R536	R613	R627	R637	R825
萘	<0.0031	<0.0031	<0.0031	<0.0031	<0.0031
芴	<0.0018	<0.0018	<0.0018	<0.0018	<0.0018
苊	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006
菲	<0.0020	<0.0020	<0.0020	0.054	0.14
蒽	<0.0020	<0.0020	<0.0020	<0.0020	0.016
荧蒽	0.57	0.052	0.020	0.035	0.19
苝	<0.0028	<0.0028	<0.0028	<0.0028	<0.0028
苯并[a]蒽	0.60	0.055	0.018	0.020	0.056
屈	0.64	0.050	0.019	0.023	0.039
苯并[b]荧蒽	1.17	0.072	0.039	0.022	0.040
苯并[k]荧蒽	0.43	0.020	0.013	0.010	0.025
苯并[a]芘	0.97	0.062	0.032	0.019	0.059
二苯并[a,h]蒽	<0.0004	<0.0004	<0.0004	<0.0004	<0.0004
苯并[g,h,i]芘	0.84	0.033	0.024	0.014	0.11
茚并[1,2,3-c,d]芘	<0.0009	<0.0009	<0.0009	<0.0009	0.072

从表 4 结果可以看出,以上采样分析地区的 PAHs 污染比较严重,土壤样品 R536 的苯并[b]荧蒽含量高达 1.17mg/kg,每千克土壤样品的 15 种 PAHs 含量范围由微克级到毫克级不等,这就要求方法具有很强的分离特性和高灵敏度,及低检出限和高精密度。本方法能够完全满足土壤样品的 PAHs 检测分析要求,方法快速、准确、可靠,具有推广应用价值。

参考文献:

[1] Baek S O, Field R A, Goldstone M E, et al. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source, fate and behavior[J]. Water, Air and Soil Pollution, 1991, 60: 279-300.

[2] Basheer C, Obbard J P, Keeie H. Persistent organic pollutants in singapore's coastal marine environment: Part 1, sediments[J]. Water, Air and Soil Pollution, 2003, 149: 315-323.

成中间体:对硝基苯甲酸乙酯;(3)降解产物:对氨基苯甲酸。故选取上述3种物质与苯佐卡因混合制备色谱条件系统适应性溶液。

有关物质测定结果显示,本品的单个最大杂质及其他主要杂质峰均在主峰2.5倍保留时间内出峰,且在进行破坏性实验考察时,各破坏条件下的色谱图中,主峰2.5倍保留时间后均无杂质峰出现,因此确定本品有关物质检查的保留时间为主峰保留时间的2.5倍。

中国药典中采用薄层色谱法对苯佐卡因的有关物质进行检查,本实验对药典方法和HPLC法进行了比较,数据结果表明,采用薄层色谱法只能进行半定量检查,而HPLC法能准确定量测定苯佐卡因中

有关物质。

本方法操作简单,测定快速、准确,专属性好,可以同时测定苯佐卡因的含量和有关物质,作为原料的测定方法,对存在的有关杂质和破坏条件下产生的降解产物进行监控。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[Z]. 北京:中国医药科技出版社,2010:439.
- [2] 刘太泽,肖鉴谋,刘奉强,等. 苯佐卡因合成工艺的改进[J]. 化工中间体,2009(9):34-36.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第247页)

- [3] Yang X P, Shi B F, Zhang Y H, et al. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil by constant energy synchronous fluorescence detection[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2008, 69: 400-406.
- [4] 冯克亮. 概述多环芳烃在自然环境中的分布与监测[J]. 海洋环境科学, 1991, 10(4): 74-76.
- [5] 张玲金, 苏建茹, 周立军, 等. 固体模拟样品中多环芳烃有机污染物提取方法研究[J]. 岩矿测试, 2003, 22(2): 113-116.
- [6] Zhu Lizhong, Cai Xuefen, Wang Jing. PAHs in aquatic sediment in Hangzhou, China: Analytical methods, pollution pattern, risk assessment and sources [J]. J Environ Sci, 2005, 17(5): 748-755.
- [7] 张兰英, 刘娜, 孙立波. 现代环境微生物技术[M]. 北京:清华大学出版社, 2005: 22.
- [8] 国家环境保护总局. 全国土壤污染调查分析测试方法技术规定[S]. 2006.
- [9] 尤孝方, 李晓东, 倪明江, 等. 商用垃圾流化床焚烧炉多

环芳烃排放的环境评价[J]. 环境科学学报, 2003, 23(2): 262-266.

- [10] 毕洪亮, 张浩原, 孙翠香, 等. 蔬菜中多环芳烃的GC-MS分析[J]. 分析测试学报, 2007, 26(4): 530-532.
- [11] 肖荣辉, 马继平, 鹿文慧, 等. 竹炭固相萃取/气相色谱-质谱联用对环境水样中16种多环芳烃的测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(9): 1022-1026.
- [12] 陶敬奇, 王超英, 李碧芳, 等. 固相微萃取-高效液相色谱联用分析环境水样中的痕量多环芳烃[J]. 色谱, 2003, 21(6): 599-602.
- [13] 樊虎, 盛良全, 童红武, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定卷烟主流烟空气中的多环芳烃[J]. 分析测试学报, 2005, 24(1): 103-105.
- [14] 国家环境保护总局. 全国土壤污染状况调查质量保证技术规定[S]. 2006.

(责任编辑:邓大玉)