

高效液相色谱-荧光检测法测定土壤中的多环芳烃

钱 薇, 倪进治, 骆永明, 李秀华, 邹德勋

(中国科学院南京土壤研究所土壤与环境生物修复研究中心 土壤与农业可持续发展
国家重点实验室, 江苏 南京 210008)

摘要 :多环芳烃(简称 PAHs)是一类具有致癌、致畸以及能够诱导有机体突变的环境有机污染物。可靠的 PAHs 检测方法是研究其环境行为的重要保证。由于高效液相色谱-荧光检测法具有不需要高温、对某些 PAHs 有较高的分辨率和高灵敏度、柱后流出组分便于收集进行光谱鉴定等优点,近年来被广泛应用于 PAHs 的检测。实验在对美国环保局 (USEPA) 优先监测的 15 种 PAHs 污染物在土壤中的含量进行测定时,重点优化了梯度洗脱程序和检测波长程序。优化后的方法对 15 种 PAHs 的最低检出限为 0.12 ~ 1.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率为 73% ~ 126%,相对标准偏差为 0.53% ~ 3.57%。结果表明,该方法用于测定土壤中 PAHs 的含量,具有检出限低、灵敏度高和重复性好等优点,是一个较为可靠的检测方法。

关键词 :高效液相色谱法 ;荧光检测 ;多环芳烃 ;土壤

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)02-0221-05 栏目类别 :研究论文

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

QIAN Wei, NI Jinzhi, LUO Yongming, LI Xiuhua, ZOU Dexun

(State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Soil and Environment Bioremediation Research Center,
Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract :Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are the environmental organic pollutants which can induce cancers, teratogeny and organism saltation. Therefore, a reliable detection method is essential for studying the environmentally hazardous PAHs. The high performance liquid chromatography with a highly sensitive fluorescence detector was introduced to determine 15 PAHs of the priority pollutants named by the US Environmental Protection Agency (EPA) in soil. The gradient elution procedure was improved and the detection wavelength was optimized. The detection limits and the recoveries of the improved method for the 15 PAHs were in the ranges of 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 1.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 73% to 126%, respectively. The relative standard deviations of this method were in the range of 0.53% to 3.57%. The results indicated that this method is a reliable detection method with low detection limit, high sensitivity and repeatability for the determination of PAHs in soil.

Key words :high performance liquid chromatography (HPLC) ;fluorescence detection ;polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ;soil

多环芳烃 (PAHs) 是一类具有致癌、致畸以及能够诱导有机体突变的环境有机污染物^[1,2], 电子产品以及油污、垃圾、作物秸秆、轮胎、橡胶、塑料等有机化合物的不完全燃烧和还原状态下的热分解都会产生 PAHs^[3-5]。由于 PAHs 具有脂溶性特征, 可以通过大气沉降作用经植物叶片吸收直接进入植物

体内, 或者通过污泥施用和污水灌溉进入土壤中由植物根系吸收, 并在植物体内迁移、代谢和积累, 进而通过食物链危及人类健康^[6], 因此 PAHs 污染的危害及其风险评估已成为当今环境保护领域的重要研究课题^[7,8]。

目前分离和测定 PAHs 的主要方法^[9] 有气相色谱

收稿日期 2006-06-05

第一作者 :钱 薇,女,助理工程师, Tel : (025) 86881130, E-mail :wqian@issas.ac.cn.

通讯联系人 :骆永明,男,研究员,“973”项目首席科学家, Tel : (025) 86881101, E-mail :ym Luo@issas.ac.cn.

基金项目 :中国科学院知识创新工程方向项目 (No. KZCX3-SW-429)、国家自然科学基金重点基金项目 (No. 40432005) 和科技部国家
重点基础研究发展规划“973”项目 (No. 2002CB410810) 共同资助。

谱法^[10,11]、气相色谱-质谱法^[12]、高效液相色谱法^[13-15]、纸色谱荧光光度法^[16]、薄层色谱法^[17]等。由于 PAHs 具有半挥发性和不挥发性特点,而高效液相色谱柱的柱温通常较低,不同于气相色谱需要程序升温至很高的温度,所以被广泛用于 PAHs 的定性定量检测;又因荧光检测器具有高灵敏度、高分辨率、低检出限和对某些物质具有高选择性等特点,在高效液相色谱法中常被采用,因此本文采用高效液相色谱-荧光检测法,以美国环保局(USEPA)提出的 16 种优先监测的 PAHs 中的 15 种(因其中的二氢苊的荧光反应较弱而未计入)作为目标化合物,通过优化和筛选梯度洗脱程序、检测波长程序、流速、柱温等一系列色谱条件,使得 15 种 PAHs 在 70 min 内都能得到很好的分离。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

仪器 日本岛津 Class-vp 高效液相色谱分析系统,配 RF-10AXL 荧光检测器,OTO-10ASVP 柱温箱,LC-10AT 二元梯度泵。

试剂 15 种 PAHs 标准品均购自美国 Supelco 公司,乙腈购自美国 Tedia 公司,水为 Milli-Q 超纯水(美国 Easypure RF 超纯水仪制备)。

1.2 标准储备液的配制

准确称取萘(NaP)、苊(AcPy)、芴(Flu)、菲(PhA)、蒽(AnT)、荧蒽(FluA)、芘(Pyr)、苯并[a]蒽(BaA)、蒾(Chr)、苯并[b]荧蒽(BbF)、苯并[k]荧蒽(BkF)、苯并[a]芘(BaP)、二苯并[a,h]蒽(DbA)、苯并[g,h,i]芘(BghiP)、茚并[1,2,3-cd]芘(In[1,2,3-cd]P)各0.025 0 g,分别用乙腈溶解并稀释定容至 100 mL,配成质量浓度为 250 mg/L 的标准储备液,然后用注射器分别注入于若干个特制长颈安瓿瓶中,随即用火焰喷枪快速封口,再置于 4 ℃冰箱内保存待用。

1.3 土壤样品的预处理

称取 5.000 g 冷冻干燥后的土样,用二氯甲烷索氏提取 24 h,将提取液旋转蒸干,再加入 2.00 mL 环己烷溶解,吸取 0.50 mL 过硅胶柱,用正己烷-二氯甲烷(体积比为 1:1)混合溶液洗脱。弃去前 1 mL 洗脱液后开始收集。收集 2.00 mL 洗脱液,用纯氮吹干,再用乙腈溶解并定容至 1 mL 后待上机测定^[18]。

1.4 色谱条件

分离柱为美国 Varian ChromSpher 5 PAH 柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm,ChromSep stainless steel),保护柱(10 mm × 3 mm,5 μm,ChromSep

stainless steel),柱温 30 ℃,进样量 20 μL。荧光检测器的发射波长(λ_{Em})和激发波长(λ_{Ex})的检测程序见表 1,流动相为乙腈(A)和水(B),其梯度洗脱程序为 60% A $\xrightarrow{40\text{ min}}$ 90% A $\xrightarrow{30\text{ min}}$ 100% A,流速为 0.5 mL/min (23 min) $\xrightarrow{37\text{ min}}$ 1.0 mL/min (10 min)。

表 1 多环芳烃的检测波长程序
Table 1 Detection wavelength program of PAHs

Time/min	λ _{Ex} /nm	λ _{Em} /nm
0	270	323
23	252	370
26	252	402
30	280	460
33	270	390
47	290	410
65	290	500

2 色谱条件的选择和优化

在实际测定中,液相色谱的泵压会随着进样次数的增多而逐渐升高,泵压的升高会使得 PAHs 各组分的保留时间有所漂移,最终导致 PAHs 各组分不能在相应的波长下出峰。本方法就上述问题进行了研究,发现合理地优化液相色谱条件,特别是选择合适的色谱柱、流动相梯度洗脱程序和检测波长程序等,可以减缓因泵压升高而导致的 PAHs 各组分保留时间的漂移,使 15 种 PAHs 组分在 70 min 内都能得到较好的分离。所建立的方法重现性较好,对测定土壤中痕量、微量 PAHs 具有灵敏度高、检出限低等优点。

2.1 色谱柱的选择

PAHs 是由 2 个或 2 个以上的苯环以线性、角状或簇状稠合在一起的化合物^[19],极性很弱,目前常用非极性键合固定相的反相色谱柱来分离。在众多的 PAHs 系列专用柱中,通过比较试验,最终选择了 Varian ChromSpher 5 PAH 专用色谱柱,柱填料为表面键合 C₁₈ 烷基的硅胶。这种填料的色谱柱的最大优点是可以使用梯度淋洗,柱效高,分离度好,分离时间短,适于分离多环芳烃这类非极性及极性较弱的低极性化合物^[20]。本实验的结果表明,采用该色谱柱,15 种 PAHs 组分的分离效果较佳。

2.2 梯度洗脱程序的优化

为了使分子结构相差很大的 PAHs 在适宜的时间内全部出峰,实验中采用流动相梯度洗脱程序。考虑到色谱柱、梯度泵的最大承受压力(最大压力 ≤250 MPa),对梯度洗脱程序进行了重点优化。经过反复调节流动相乙腈和水的体积比,最终把乙腈的初始体积分数设为 60%,之后再随洗脱时间的增

加,逐渐加大乙腈的体积分数至 100%,这样才能完全洗脱 PAHs 组分,且各组分的荧光响应值较高。

实验证明,流速的变化对 PAHs 的保留时间和泵压的影响较大,也很容易造成仪器基线的波动。如果保持流速为 1.0 mL/min 不变进行恒流洗脱时,发现萘和芴不能完全分开,泵压约在 100 MPa 左右 如果保持流速为 0.5 mL/min 时,萘和芴分离较好,泵压会降低一半,但其他组分的保留时间相应延长一倍,不利于 PAHs 的快速分离。因此,我们在 0~23 min 之间把流速设为 0.5 mL/min,使得萘和芴能较好分离 ;在 23~60 min 之间把流速从 0.5 mL/min 逐渐增加至 1.0 mL/min,加快其他 PAHs 组分的分离速度,缩短保留时间。在上述流速的条件下,泵压(初始压力大约为 40 MPa 左右)的波动和基线的波动(±10 mV)均较平缓。

2.3 检测波长程序的优化

荧光检测器中激发波长和发射波长的选择对 PAHs 各组分的检出限和灵敏度都有直接的影响。本方法对检测波长程序进行了多次试验、反复比较,最终根据各组分在不同波长下其荧光反应的响应值,优化筛选出最佳检测波长。结果证明,运用该波长程序,PAHs 各组分的灵敏度高,检出限低,测定土壤中痕量 PAHs 可以达到 ng/kg 级。PAHs 各组分所对应的最佳激发波长和发射波长见表 2。

表 2 多环芳烃检测的最佳波长

Table 2 The best detection wavelength of PAHs nm

Peak No. in Fig. 1	PAH	λ_{Ex}	λ_{Em}
1	NaP	270	323
2	AcPy	270	323
3	Flu	270	323
4	PhA	252	370
5	AnT	252	402
6	FluA	280	460
7	Pyr	270	390
8	BaA	270	390
9	Chr	270	390
10	BbF	290	410
11	BkF	290	410
12	BaP	290	410
13	DbA	290	410
14	BghiP	290	410
15	In[1,2,3-cd]P	290	500

NaP : naphthalene ; AcPy : acenaphthylene ; Flu : fluorene ;
PhA : phenanthrine ; AnT : anthracene ; FluA : fluoranthene ;
Pyr : pyrene ; BaA : benzo [a] anthracene ; Chr : chrysene ;
BbF : benzo [b] fluoranthene ; BkF : benzo [k] fluoranthene ;
BaP : benzo [a] pyrene ; DbA : dibenzo [a , h] anthracene ;
BghiP : benzo [g , h , i] perylene ; In [1 , 2 , 3 - cd] P : indeno [1 , 2 , 3 - cd] pyrene .

2.4 柱温的优化

在本实验中,分别设定柱温为 20,30,40,50 ℃ ,

结果发现柱温只对 PAHs 各组分的保留时间和分离度有很大影响,对色谱峰的峰面积影响不大。当柱温为 20 ℃ 时,保留时间太长 ;当柱温为 40 ℃ 和 50 ℃ 时,保留时间明显缩短,但萘和芴不能完全分离 ;最终我们选择柱温为 30 ℃ 。在此温度下,PAHs 各组分可在 70 min 内较好分离。图 1 为 PAHs 标准样品的色谱分离图。由图 1 可见,15 种 PAHs 组分在上述色谱条件下得到了充分的洗脱和良好的分离。

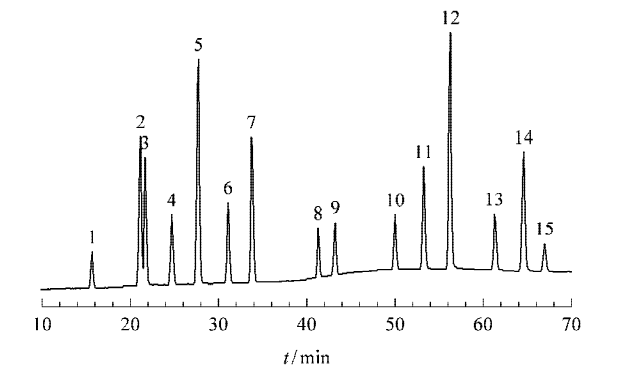


图 1 多环芳烃混合标准溶液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a mixture of the PAH standards

Peaks : 1. NaP (100 μg/L) ; 2. AcPy (200 μg/L) ; 3. Flu (60 μg/L) ; 4. PhA (80 μg/L) ; 5. AnT (80 μg/L) ; 6. FluA (80 μg/L) ; 7. Pyr (100 μg/L) ; 8. BaA (20 μg/L) ; 9. Chr (40 μg/L) ; 10. BbF (80 μg/L) ; 11. BkF (20 μg/L) ; 12. BaP (80 μg/L) ; 13. DbA (40 μg/L) ; 14. BghiP (160 μg/L) ; 15. In [1 , 2 , 3 - cd] P (160 μg/L) .

3 结果与讨论

3.1 方法的线性关系、最低检出限及精密度

取出 15 种已封装好的 PAHs 标准储备液,放至室温后用乙腈稀释定容,配成下列质量浓度的混合标准溶液 :萘 100 μg/L、萘 200 μg/L、芴 60 μg/L、菲 80 μg/L、蒽 80 μg/L、荧蒽 80 μg/L、芘 100 μg/L、苯并 [a] 蒽 20 μg/L、蒾 40 μg/L、苯并 [b] 荧蒽 80 μg/L、苯并 [k] 荧蒽 20 μg/L、苯并 [a] 芘 80 μg/L、二苯并 [a , h] 蒽 40 μg/L、苯并 [g , h , i] 芘 160 μg/L、茚并 [1 , 2 , 3 - cd] 芘 160 μg/L。

将上述混合标准溶液用乙腈依次稀释 1 倍、2 倍、4 倍、10 倍,得到系列浓度的标准溶液,分别进行 HPLC 测定。用峰面积和各组分的质量浓度作图,计算 PAHs 各组分的回归方程及相关系数,结果表明 PAHs 各组分线性关系良好(见表 3)。

一天内 6 次平行进样得到的含量测定值的相对标准偏差(RSD)为 0.53%~3.6%。方法的精密度高,重现性好。15 种多环芳烃组分的最低检出限(以信噪比 S/N = 3 计)的范围为 0.12~1.57 μg/kg,结果详见表 3。

表 3 本方法的线性方程和检测限

Table 3 Regression equations and detection limits (LODs) of the method

PAH	<i>r</i>	Regression equation ¹⁾	LOD/(μg/kg)
NaP	0.9944	$y = 15549x + 56898$	1.57
AcPy	0.9985	$y = 35261x + 184901$	0.86
Flu	0.9978	$y = 103724x + 72764$	0.33
PhA	0.9988	$y = 44884x + 44187$	0.76
AnT	0.9992	$y = 140976x + 125599$	0.24
FluA	0.9988	$y = 38727x + 92240$	0.78
Pyr	0.9995	$y = 68835x + 202668$	0.42
BaA	0.9997	$y = 109624x + 14242$	0.25
Chr	0.9989	$y = 60194x + 13020$	0.49
BbF	0.9980	$y = 31874x + 71111$	0.80
BkF	0.9992	$y = 246552x + 103746$	0.12
BaP	0.9978	$y = 150929x - 60672$	0.23
DbA	0.9960	$y = 73183x + 96426$	0.42
BghiP	0.9980	$y = 44243x + 167932$	0.82
In[1,2,3-cd]P	0.9990	$y = 10602x + 29655$	0.61

1) *y*: peak area; *x*: mass concentration, μg/L.

3.2 方法的加标回收率

在已知样品中加入 3 个不同质量浓度的 PAHs 标样,按“ 1.3 ”节所述进行样品预处理后进行 HPLC 测定,计算出 PAHs 样品的回收率范围为 73% ~ 126%,结果详见表 4。

表 4 本方法的回收率

Table 4 Recovery of the method

PAH	Background/(μg/L)	Added/(μg/L)	Found/(μg/L)	Recovery/%
NaP	8.90	25	28.44	78.16
	8.90	50	45.61	73.42
	8.90	75	82.66	98.35
AcPy	0.66	50	48.46	95.60
	0.66	100	90.00	89.34
	0.66	150	136.46	90.53
Flu	4.24	15	18.82	97.20
	4.24	30	33.62	97.93
	4.24	45	48.62	98.62
PhA	35.45	20	51.15	78.50
	35.45	40	65.12	74.18
	35.45	60	99.14	106.15
AnT	5.40	20	25.63	101.15
	5.40	40	42.91	93.78
	5.40	60	72.27	111.45
FluA	46.00	25	70.58	98.32
	46.00	50	88.43	84.86
	46.00	75	116.31	93.75
Pyr	41.24	25	59.84	74.40
	41.24	50	77.66	72.84
	41.24	75	115.73	99.32
BaA	16.76	5	20.96	84.00
	16.76	10	25.17	84.10
	16.76	15	29.94	87.87
Chr	16.21	10	28.85	126.40
	16.21	20	36.50	101.45
	16.21	30	46.97	102.53

表 4 (续)

Table 4 (Continued)

PAH	Background/(μg/L)	Added/(μg/L)	Found/(μg/L)	Recovery/%
BbF	21.50	20	41.62	100.60
	21.50	40	56.90	88.50
	21.50	60	84.60	105.17
BkF	8.28	5	13.26	99.60
	8.28	10	18.72	104.40
	8.28	15	24.29	106.73
BaP	17.73	20	36.93	96.00
	17.73	40	56.49	96.90
	17.73	60	82.90	108.62
DbA	1.55	10	11.10	95.50
	1.55	20	22.40	104.25
	1.55	30	31.43	99.60
BghiP	18.22	40	56.00	96.45
	18.22	80	94.27	95.06
	18.22	120	138.51	100.24
In[1,2,3-cd]P	6.70	40	44.45	94.38
	6.70	80	85.86	98.95
	6.70	120	127.20	100.42

3.3 土壤样品中 PAHs 的提取和定量分析结果

本实验用上述色谱方法,测定了长江三角洲地区 10 个农田的土壤样本。按“ 1.3 ”节所述对其进行提取后上机测定,根据 PAHs 标准品的保留时间确定样品中的 PAHs 种类,再根据各组分的峰面积值用外标法进行定量。典型的土壤样品的色谱图如图 2 所示,10 个土壤样品中的 PAHs 含量见表 5。由表 5 可以看出,实际土壤样品中的 PAHs 的含量一般在 μg/kg 级 ~ ng/kg 级范围,这就要求相应的分析方法和仪器必须具有高灵敏度、低检出限,以及很强的分离和定性能力,而本实验所采用的液相色谱-荧光检测法能够满足土壤样品中 PAHs 的检测要求,尤其能快速、准确地检测土壤中残留的微量、痕量的 PAHs,相信该方法在食品、医药等领域中也会有广阔的应用前景。

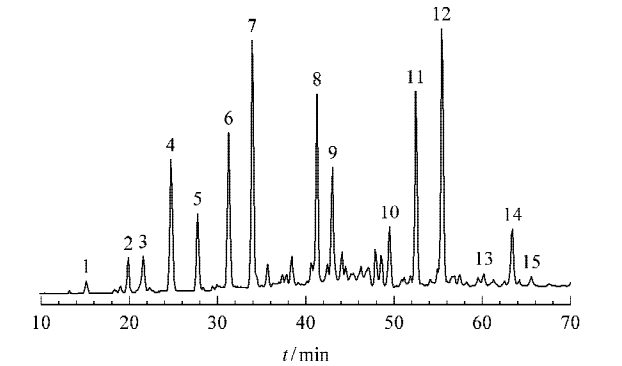


图 2 土壤样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a soil sample

For peak identifications, see Fig. 1.

表 5 10 个土壤样品中多环芳烃的测定结果

Table 5 Determination results of the PAHs in ten soils

PAH	Contents/($\mu\text{g/kg}$)	RSD/%
NaP	2.37 – 33.76	3.21
AcPy	1.69 – 106.67	1.90
Flu	8.42 – 18.34	1.05
PhA	22.94 – 115.80	2.34
AnT	0.96 – 6.25	0.76
FluA	21.98 – 100.41	0.75
Pyr	25.12 – 107.25	3.57
BaA	3.72 – 47.32	1.46
Chr	7.40 – 52.64	0.61
BbF	9.98 – 61.13	0.99
BkF	2.79 – 25.03	0.63
BaP	4.22 – 46.05	0.64
DbA	0.77 – 5.48	1.62
BghiP	6.24 – 54.76	1.77
In [1,2,3- <i>cd</i>] P	2.01 – 43.39	0.53

参考文献：

[1] Panther B C, Hooper M A, Tapper N J. Atoms Environ, 1999, 33 (24/25) :4 087

[2] Sheu H L, Lee W J, Su C C, Chao H R, Fan Y C. J Environ Eng, 1996, 122 (12) :1 101

[3] Sims R C, Overcash M R. Residue Rev, 1983, 88 :1

[4] Mahmood S K, Rao P R. Bull Environ Contam Toxicol, 1993, 50 (4) :486

[5] Joner E J, Corgie S C, Amellal N, Leyval C. Soil Biol Biochem, 2002, 34 :859

[6] Jones K C. Environ Pollut, 1991, 69 (4) :311

[7] Zhao Y Y, Ma Y A. Marine Environmental Science (赵云英,

马永安. 海洋环境科学), 1998, 17 (2) :68

[8] Gu M B, Chang S T. Biosens Bioelectron, 2001, 16 :667

[9] Dong X Y, Yang Y W, Ren Q L. Chinese Journal of Chromatography (董新艳, 杨亦文, 任其龙. 色谱), 2005, 23 (6) :609

[10] Liu Z S, Wey M Y, Lin C L. J Hazard Mater, 2002, 91 :129

[11] You X F, Li X D, Ni M J, Yan J H, Cen K F. Acta Scientiae Circumstantiae (尤孝方, 李晓东, 倪明江, 严建华, 岑可法. 环境科学学报), 2003, 23 (2) :262

[12] Li Y X, Zhang H, Mao L S, Sun C J. Chinese Journal of Chromatography (李永新, 张宏, 毛丽莎, 孙成均. 色谱), 2003, 21 (5) :476

[13] Xie C G, Yang Z Y. Chinese Journal of Chromatography (谢重阁, 杨志勇. 色谱), 1986, 4 (3) :133

[14] Yang Y L, Meng D L, Yang G R, Hu Q F, Yin J Y. Chinese Journal of Analytical Chemistry (杨亚玲, 孟东玲, 杨国容, 胡秋芬, 尹家元. 分析化学), 2003, 31 (7) :890

[15] Tao J Q, Wang C Y, Li B F, Li G K. Chinese Journal of Chromatography (陶敬奇, 王超英, 李碧芳, 李攻科. 色谱), 2003, 21 (6) :599

[16] Hoffmann D, Wynder E L. Cancer, 1960, 13 :1 062

[17] Oakley E T, Johnson L E, Stahr H M. Tob Sci, 1973, 16 :19

[18] Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, Song J, Wu L H, Xing W Q, Li Z G, Tao S. Acta Pedologica Sinica (丁克强, 骆永明, 刘世亮, 宋静, 吴龙华, 邢维芹, 李振高, 陶澍. 土壤学报), 2004, 41 (3) :348

[19] Juhasz A L, Naidu R. Int Biodeterior Biodegradation, 2000, 45 :57

[20] Yu S L. The Methods and Applications of High Performance Liquid Chromatography. 2nd ed. Beijing :Chemical Industry Press (于世林. 高效液相色谱方法及应用. 第 2 版. 北京 :化学工业出版社), 2005 :72