

在线固相萃取-高效液相色谱法测定水体中的多环芳烃

陈 静¹ 戴振宇² 许 群^{* 2} 张祥民^{* 1}

¹(复旦大学化学系, 上海 200433) ²(赛默飞世尔科技(中国) 有限公司, 上海 201206)

摘 要 建立了在线固相萃取-液相色谱测定水体残留的多环芳烃的方法, 用于测定自来水中的 20 种多环芳烃(PAHs)。直接进样 1 mL 经过过滤的水体样品, 其中的被测组分富集在 SPE 柱(Acclaim PA II, 50 mm×4.6 mm, 3 μm) 上, 在线完成净化和萃取富集; 再通过阀切换将它们转移至分析流路, 在 Hypersil Green PAH 色谱柱(150 mm×3 mm, 3 μm) 上分离检测。在线固相萃取流路以水和乙腈为流动相, 0.4 和 0.6 mL/min 流速梯度富集/萃取和洗脱; 分析流路亦以水和乙腈为流动相, 0.8 mL/min 流速梯度洗脱, 采用紫外 254 nm 检测无荧光效应的萘和弱荧光效应的萘, 其它的多环芳烃化合物则于不同的荧光检测通道里, 在其对应的最大激发/发射波长下灵敏测定。整个分析流程 32 min 即可完成。20 种 PAHs 的保留时间的相对标准偏差均小于 0.2%, 色谱峰面积的相对标准偏差均小于 1.3% ($n=7$); 在 3 个浓度数量级范围内峰面积与进样质量浓度的线性相关系数均大于 0.9910, 0.05 μg/L 的自来水加标样品的回收率为 57%~140%, 5 μg/L 的自来水加标样品的回收率为 85%~116%; 多数有荧光响应的 PAHs 的方法检出限均小于 0.02 μg/L ($S/N=3$)。

关键词 在线固相萃取; 多环芳烃; 高效液相色谱; 水样

1 引 言

存在于饮用水和食用油中的多环芳烃由于其潜在的致癌和致突变属性, 大多数国家都对其含量有所规定和限制。目前使用比较广泛的检测多环芳烃的 3 种标准方法是 EPA 550、EPA 550.1 和 EPA 610, 所采用的样品前处理方法是液-液萃取和离线固相萃取(SPE) ^[1~4], 其中的重要步骤旋转蒸发和氮气辅助蒸发均易引入误差, 导致重现性差、测定结果不准确。文献[5, 6]采用在线固相萃取-高效液相色谱(Online SPE-HPLC) 方法(ThermoFisher Scientific) 测定了饮用水和食用油中的低浓度的多环芳烃。相对于传统的测定方法, 此方法有着自动运行、降低成本、重现性好、过程可控等特点。本研究采用 Hypersil Green PAH 专用色谱柱通过优化控制流程, 进一步缩短了分离时间, 提高了分析灵敏度。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Thermo UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 配置六通道在线脱气机、双三元梯度泵、自动进样器(带大体积进样组件)、柱温箱(带一个 2p-6p 切换阀, 即 2 位六通阀)、二极管阵列检测器(DAD)、荧光检测器(FLD), 变色龙色谱管理软件 Chromeleon 7.2 (美国赛默飞世尔公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher 公司); 去离子水(18.2 MΩ cm); 18 个多环芳烃的混合标样(1000 mg/L, 溶于二氯甲烷, 萘(Naphthalene), 萘烯(Acenaphthylene), 萘(Acenaphthene), 芴(Fluorene), 菲(Phenanthrene), 蒽(Anthracene), 荧蒽(Fluoranthene), 芘(Pyrene), 苯并(a) 蒽(Benzo(a) anthracene), 蒽(Chrysene), 苯并(j) 荧蒽(Benzo(j) fluoranthene), 苯并(e) 芘(Benzo(e) pyrene), 苯并(b) 荧蒽(Benzo(b) fluoranthene), 苯并(k) 荧蒽(Benzo(a) pyrene), 苯并(a) 芘(Benzo(k) fluoranthene), 二苯并(a, h) 蒽(Dibenz(a, h) anthracene), 苯并(g, h, i) 芘(Benzo(g, h, i) perylene), 茚并(1, 2, 3-cd) 芘(Indeno(1, 2, 3-cd) pyrene), 安谱公司; 1-甲基萘(1-Methylnaphthalene), 2-甲基萘(2-Methylnaphthalene), 均购自 AccuStandard 公司。

2014-07-08 收稿; 2014-10-15 接受

* E-mail: qun.xu@thermofisher.com

2.2 标准储备溶液和标准工作溶液配制

混合标准储备溶液 1: 用甲醇将 1-甲基萘和 2-甲基萘配制成 1000 mg/L 的溶液, 取适量 1-甲基萘甲醇溶液、2-甲基萘甲醇溶液和 18 个多环芳烃混合物配制成混合标样溶液, 用甲醇稀释, 配制成 20 个多环芳烃组分均为 10 mg/L 的混合标准储备溶液 1。

混合标准储备溶液 2: 取适量混合标准储备溶液 1, 用甲醇稀释, 配制成 20 个多环芳烃组分均为 1 mg/L 的混合标准储备溶液 2。

混合标准工作溶液: 分别取适量的混合标准储备溶液 1 和 2, 用水稀释并定容, 得到多环芳烃组分浓度分别为 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的 9 个混合标准工作溶液。

2.3 样品准备

自来水样, 0.45 μm 尼龙水相滤膜过滤后, 待测。

加标样品 1, 在一定体积的自来水样中加入适量混合标准储备液 2, 使多环芳烃组分浓度均为 5 $\mu\text{g/L}$ 。

加标样品 2, 在一定体积的自来水样中加入适量的浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作溶液, 使多环芳烃组分浓度均为 0.05 $\mu\text{g/L}$ 。

2.4 色谱条件

在线固相萃取(Online SPE): 富集柱 Acclaim PA2(50 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm , 美国赛默飞世尔公司); 流动相为纯水和乙腈, 进样体积 1 mL; 梯度见表 1。

分离: 分析柱 Hypersil Green PAH(150 mm $\times$ 3 mm, 3 μm , 美国赛默飞世尔公司); 流动相为纯水和乙腈; 流速 0.8 mL/min; 梯度洗脱条件见表 1; 柱温, 30 $^{\circ}\text{C}$; UV 检测, 254 nm; 荧光检测, 不同的被测化合物在其相应的激发和发射波长下检测, 见表 2。

表 1 用于在线固相萃取和分离的梯度

Table 1 Gradient programs for online SPE and separation

在线固相萃取 Online SPE				分离 Separation			
时间 Time (min)	流速 Flow rate (mL/min)	流动相 Mobile phase		时间 Time (min)	流速 Flow rate (mL/min)	流动相 Mobile phase	
		水 Water (%)	乙腈 Acetonitrile (%)			水 Water (%)	乙腈 Acetonitrile (%)
0	0.6	95	5	0	0.8	60	40
4.0	0.6	95	5	5	0.8	60	40
4.5	0.4	0	100	30	0.8	0	100
25	0.4	0	100	30.5	0.8	60	40
25.5	0.6	95	5	35	0.8	60	40
35	0.6	95	5	—	—	—	—

2.5 在线固相萃取流程

基于 Thermo UltiMate 3000 $\times$ 2 双梯度系统, 本研究中的 Online SPE-HPLC 流程如图 1 所示。初始阀为 1-2 位, 1 mL 样品直接进样至 SPE 柱; 经过在线萃取(样品富集、净化)后, 阀切至 1-6 位, SPE 柱上的目标分析物被冲入分析流路。待被分析物完全进入分析流路后, 在分析柱进行分离测定。此时, 阀再次切回到 1-2 位, SPE 柱进行再生(净化), 为下一个样品分析做准备。

3 结果与讨论

3.1 多环芳烃的 Online SPE-HPLC 分离

Acclaim PA2 柱可以耐受大体积纯水相进样,

且已有文献报道此柱合适于使用低比例有机相(5%乙腈)在线萃取(富集)水中的多环芳烃, 并且能够

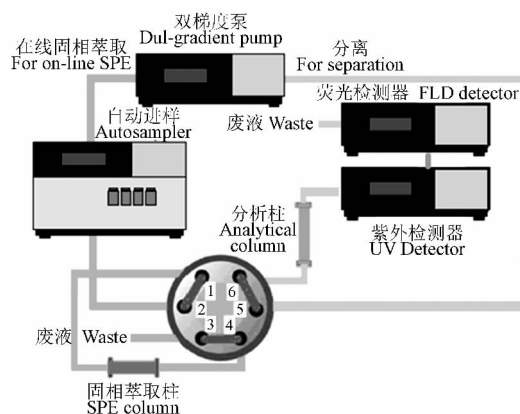


图 1 在线固相萃取-高效液相色谱系统流程图

Fig.1 Flow schematic of online SPE-HPLC

使用高比例有机相(90%乙腈)从 SPE 柱上有效洗脱^[6]。具有高碳含量的 Hypersil Green PAH 色谱柱是专门为多环芳烃分离设计的专用柱,如图 2 所示,20 个多环芳烃化合物在 2.4 节所示的色谱条件下实现基线分离。

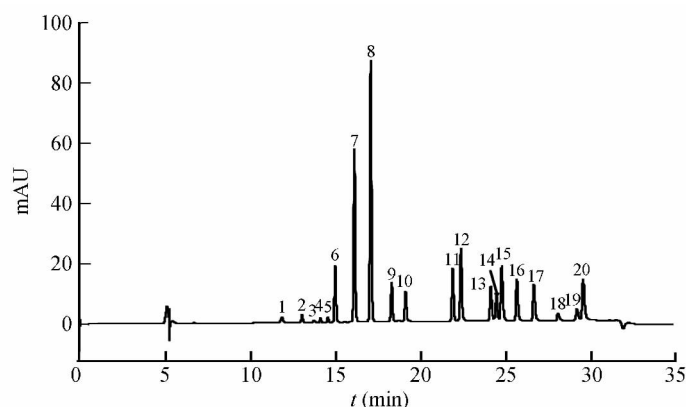


图 2 浓度均为 50 µg/L 的 20 个多环芳烃标准混合溶液的 online SPE-HPLC 色谱图(测定波长, UV 254 nm)

Fig.2 Online SPE-HPLC chromatogram of 20 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (50 µg/L) at UV 254 nm

色谱峰: 1. 萘; 2. 芴烯; 3. 1-甲基萘; 4. 2-甲基萘; 5. 芴; 6. 芴; 7. 菲; 8. 蒽; 9. 荧蒽; 10. 芘; 11. 苯并(a)蒽; 12. 蒽; 13. 苯并(j)荧蒽; 14. 苯并(e)芘; 15. 苯并(b)荧蒽; 16. 苯并(k)荧蒽; 17. 苯并(a)芘; 18. 二苯并(a,h)蒽; 19. 苯并(g,h,i)芘; 20. 茚并(1,2,3-cd)芘。

Peaks: 1. Naphthalene; 2. Acenaphthylene; 3. 1-Methylnaphthalene; 4. 2-Methylnaphthalene; 5. Acenaphthene; 6. Luorene; 7. Phenanthrene; 8. Nanthracene; 9. Fluoranthene; 10. Pyrene; 11. Benzo(a) anthracene; 12. Chrysene; 13. Benzo(j) fluranthene; 14. Benzo(e) pyrene; 15. Benzo(b) fluoranthene; 16. Benzo(a) pyrene; 17. Benzo(k) flu-oranthene; 18. Dibenz(a,h) anthracene; 19. Benzo(g,h,i) perylene; 20. Indeno(1,2,3-cd) pyrene.

3.2 激发和发射波长的设定

因为萘(图 2 中的色谱峰 1)的荧光效应很低,而芴烯(图 2 中的色谱峰 2)则无荧光效应,因此这两个化合物使用紫外检测。其它多环芳烃化合物则在各自相应的最大激发和发射波长下检测时,能够得到满意的灵敏度。测定最大激发/发射波长的方法如下:首先进样多环芳烃的混合标准溶液,使用二极管阵列检测器(DAD)在 200~850 nm 波长范围内扫描,发现各化合物的最大吸收波长均接近 220, 240 或 280 nm;然后分别以 220, 240 和 280 nm 作为激发波长,对每个化合物进行发射扫描(Emission scans),得到各化合物的最大发射波长^[7]。测定结果见表 2。

表 2 各个多环芳烃化合物的荧光检测最大激发/发射波长和切换时间

Table 2 The maximum excitation wavelength and maximum emission wavelength for each PAH and switching time

阀切换时间 Switching time (min)	检测通道 Detection channel	最大激发/发射波长 The maximum Ex/Em wavelengths (nm)	多环芳烃 PAHs	峰次序 Peak No.
0.00	No. 1	219/330	萘 Naphthalene	1
	No. 1	225/333	1-甲基萘 1-Methylnaphthalene	3
13.45			2-甲基萘 2-Methylnaphthalene	4
	No. 2	235/332	芴 Acenaphthene	5
	No. 3	263/310	芴 Fluorene	6
15.50	No. 1	247/364	菲 Phenanthrene	7
	No. 2	247/401	蒽 Anthracene	8
17.80	No. 1	281/453	荧蒽 Fluoranthene	9
	No. 2	236/389	芘 Pyrene	10
20.50	No. 1	281/391	苯并(a)蒽 Benzo(a) anthracene	11
	No. 2	264/381	蒽 Chrysene	12

续表 2(Continued to Table 2)

时间 Time (min)	检测通道 Detection channel	最大激发/发射波长 The maximum Ex/Em wavelengths (nm)	多环芳烃 PAHs	峰次序 Peak No.
23.50	No. 1	240/510	苯并(j) 荧蒽 Benzo(j) fluranthene	13
	No. 2	283/394	苯并(e) 芘 Benzo(e) pyrene	14
	No. 3	249/443	苯并(b) 荧蒽 Benzo(b) fluoranthene	15
25.40	No. 1	243/412	苯并(k) 荧蒽 Benzo(k) fluoranthene	16
	No. 2	260/408	苯并(a) 芘 Benzo(a) pyrene	17
27.50	No. 1	290/398	二苯并(a , h) 蒽 Dibenz(a , h) anthracene	18
28.70	No. 1	292/415	苯并(g , h , i) 花 Benzo(g , h , i) perylene	19
	No. 2	246/503	茚并(1 , 2 , 3-cd) 芘 Indeno(1 , 2 , 3-cd) pyrene	20

但是,在实际操作中,以目前的技术手段和实验条件,要使 20 种多环芳烃中的每个化合物都在其对应的最大激发/发射波长下实现高灵敏度测定是不现实的(需要多达 20 个通道)。因此,本研究使用 Ulti-Mate FLD-3400RS 荧光检测器的 3 个检测通道(Detection channel),通过变色龙色谱软件控制,将整个分离检测时间分割成若干个时间段,每个时间段内同时使用 3 个或 3 个以下的检测通道,在每个检测通道上设定与被测化合物相对应的最大激发/发射波长。这样就能够使得每个多环芳烃化合物都在其对应的最大激发发射波长下得到测定。表 2 列出了各个多环芳烃化合物荧光检测的切换时间、所属检测通道以及每个检测通道上设定的最大激发发射波长,图 3 则显示了在 3 个荧光检测通道中得到的多环芳烃色谱图。

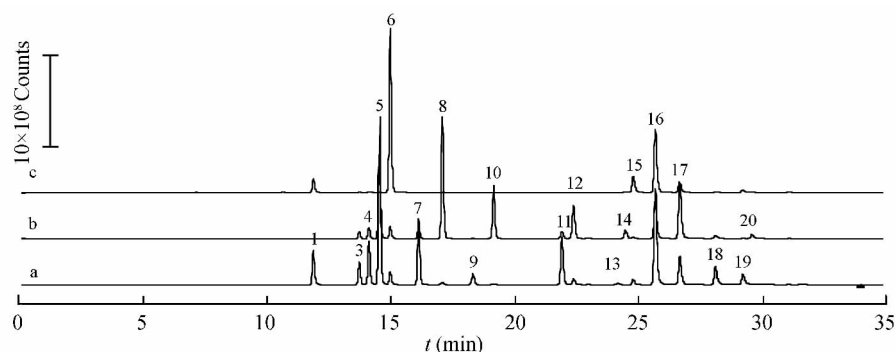


图 3 浓度均为 50 $\mu\text{g/L}$ 的 20 个多环芳烃标准混合溶液在荧光检测通道(a) No. 1 , (b) No. 2 , (c) No. 3 的 online SPE-HPLC 色谱图

Fig.3 Online SPE-HPLC chromatogram of 20 PAHs (50 $\mu\text{g/L}$ each) obtained by fluorescence detection using programmed wavelength switching in three parallel channels: (a) No. 1 , (b) No. 2 , (c) No. 3 色谱峰序号同图 2(The peak numbers are the same as in Fig.2) 。

3.3 方法重现性、线性关系和检出限

重复进样 7 次 1 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液, 荧光检测; 重复进样 7 次 10 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液, 紫外检测。保留时间的相对标准偏差(RSD) 均 $\leq 0.2\%$, 峰面积的 RSD 均 $\leq 1.3\%$ 。取 9 个不同浓度的混合标准工作溶液(0.01 , 0.05 , 0.1 , 0.5 , 1.0 , 5.0 , 10 , 50 和 100 $\mu\text{g/L}$) 每个进样 3 针, 对测定结果以峰面积对质量浓度进行线性回归, 利用外标法建立标准曲线。在信噪比 $S/N=3$ 时的测定各化合物的检测限。结果见表 3。

3.4 样品测定和回收率

测定了自来水样品, 色谱图见图 4, 自来水样中未检出多环芳烃化合物。两组加标样品(0.05 和 5.0 $\mu\text{g/L}$) 中所有多环芳烃化合物的回收率分别在 57% ~ 140% 和 85% ~ 116% 之间, 表明本方法可用于检测水体样品中多环芳烃。

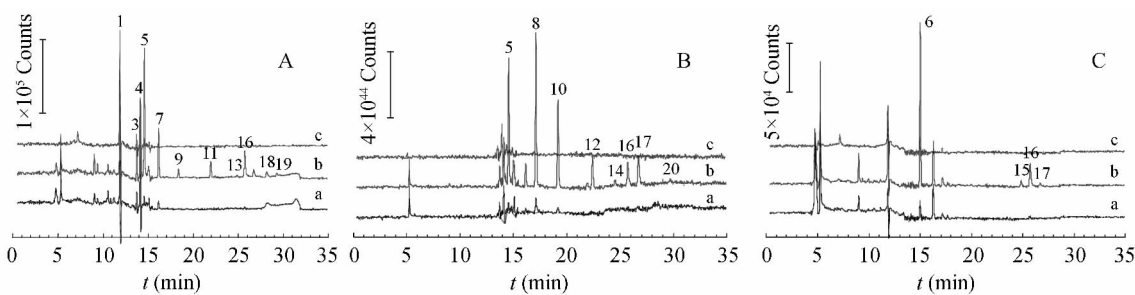


图 4 (a) 自来水样品、(b) 加标自来水样品(0.05 $\mu\text{g/L}$) 和(c) 空白在荧光检测通道(A) No. 1、(B) No. 2、(C) No. 3 的 online SPE-HPLC 色谱图

Fig.4 Online SPE-HPLC chromatogram of (a) a tap water sample, (b) the same sample spiked with 0.05 $\mu\text{g/L}$ for each PAH, and (c) reagent water obtained by fluorescence detection using programmed wavelength switching in three parallel channels: (A) No. 1, (B) No. 2, and (C) No. 3

色谱峰序号同图 2(The peak numbers are the same as in Fig.2)。

表 3 重现性、线性和检出限测定结果

Table 3 Calibration data and MDLs for 20 PAHs

序号 No.	多环芳烃 PAHs	检测方式 Method	线性曲线 Regression equation	线性相关系数 Correlation coefficient (R^2)	线性范围 Linearity range ($\mu\text{g/L}$)	检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)
1	萘 Naphthalene	紫外 UV	$A = 0.0025c + 0.0136$	0.9970	1.5 ~ 100	0.47
2	萘烯 Acenaphthylene		$A = 0.0034c + 0.0062$	0.9989	1.5 ~ 100	0.72
3	1-甲基萘 1-Methylnaphthalene		$A = 7492.48c$	0.9910	0.10 ~ 50	0.031
4	2-甲基萘 2-Methylnaphthalene		$A = 10516.8c$	0.9982	0.10 ~ 50	0.031
5	萘 Acenaphthene		$A = 110163c$	0.9972	0.05 ~ 50	0.028
6	芴 Luorene		$A = 266343c$	0.9966	0.05 ~ 50	0.016
7	菲 Phenanthrene		$A = 138211c$	0.9966	0.05 ~ 50	0.011
8	蒽 Anthracene		$A = 237397c$	0.9973	0.05 ~ 50	0.010
9	荧蒽 Fluoranthene		$A = 32560.4c$	0.9971	0.05 ~ 50	0.017
10	芘 Pyrene		$A = 148615c$	0.9965	0.05 ~ 50	0.012
11	苯并(a)蒽 Benzo(a)anthracene	荧光 Fluorescence	$A = 100842c$	0.9980	0.10 ~ 50	0.020
12	苊 Chrysene		$A = 74195.7c$	0.9986	0.10 ~ 50	0.024
13	苯并(j)荧蒽 Benzo(j)fluoranthene		$A = 2405.81c$	0.9992	0.5 ~ 100	0.156
14	苯并(e)芘 Benzo(e)pyrene		$A = 13930.5c$	0.9996	0.5 ~ 100	0.161
15	苯并(b)荧蒽 Benzo(b)fluoranthene		$A = 33121.4c$	0.9954	0.1 ~ 50	0.034
16	苯并(k)荧蒽 Benzo(k)pyrene		$A = 213065c$	0.9962	0.1 ~ 50	0.023
17	苯并(a)芘 Benzo(a)fluoranthene		$A = 122278c$	0.9969	0.1 ~ 50	0.035
18	二苯并(a,h)蒽 Dibenz(a,h)anthracene		$A = 54922.1c$	0.9997	0.1 ~ 50	0.048
19	苯并(g,h,i)芘 Benzo(g,h,i)perylene		$A = 22558.1c$	0.9998	0.5 ~ 100	0.137

总之, 本方法简化了常用的繁琐的样品前处理过程。水样经过过滤后即可直接上样自动富集测定。方法重现性好、易操作, 加标回收率符合要求, 检出限低, 能够较好地应用于水体中痕量多环芳烃残留的测定。本方法可推广应用到测定水体中其它痕量污染物, 有着很好的应用前景。

References

- Environmental Protection Agency Method 550: *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection*; U.S. Environmental Protection
- HUANG Wei, DING Jun, FENG Yu-Qi. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2012**, 40(6): 830-834
黄 维, 丁 俊, 冯钰琦. *分析化学*, **2012**, 40(6): 830-834
- Environmental Protection Agency Method 550.1: *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection*; U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, **1990**

- 4 Environmental Protection Agency Method 610: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*; U.S. Environmental Protection Agency: Cincinnati, OH, **1982**
- 5 Thermo Fisher Scientific Application Note 196: *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Edible Oils by Donor-Acceptor Complex Chromatography (DACC) -HPLC with Fluorescence Detection*. Sunnyvale, CA, **2008**. [Online] www.dionex.com/en-us/webdocs/66759-AN196_LC_PAH_EdibleOils_29Apr08_LPN1998.pdf
- 6 Thermo Fisher Scientific Application Note 213: *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Tap Water Using On-Line Solid-Phase Extraction Followed by HPLC with UV and Fluorescence Detections*. Sunnyvale, CA, **2009**. [Online] www.dionex.com/en-us/webdocs/69875-AN213-HPLCPAHs-Water-06Jan09-LPN2128.pdf
- 7 Thermo Fisher Scientific Technique Note 92: *Combining Fluorescence Detection with UHPLC: An Overview of the Technical Requirements*. Sunnyvale, CA, **2011**. [Online] www.dionex.com/en-us/webdocs/110810-TN92-UHPLC-Fluorescence-Detection-05Jul2011-LPN2716-01.pdf

Sensitive Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Online Solid Phase Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography

CHEN Jing¹, DAI Zhen-Yu², XU Qun^{* 2}, ZHANG Xiang-Min^{* 1}

¹(Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

²(ThermoFisher Scientific China, Shanghai 201203, China)

Abstract A method was developed for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water by HPLC coupled with online solid phase extraction (online SPE). After filtered, 1 mL of a water sample was injected directly, and then trapped on the SPE column (Acclaim PA II, 50 mm × 4.6 mm, 3 μm) for extraction and purification; finally, the trapped analytes were transferred to the analytical column (Hypersil Green PAH, 150 mm × 3 mm, 3 μm) for the separation using valve-switching technique. The mobile phase used for online SPE was water/acetonitrile at different flow rate (0.4 and 0.6 mL/min) in gradient elution mode; and that used for the separation was water/acetonitrile at 0.8 mL/min flow rate. UV wavelength was set at 254 nm for the determination of naphthalene and acenaphthylene with no/very weak fluorescent response; fluorescence detection using programmed wavelength switching in three parallel channels was used for the other PAHs. The whole analysis process including online SPE and separation was completed within 32 min. The relative standard deviation (RSD) of 20 PAHs were all less than 0.16% for retention time, and less than 1.3% for peak area ($n=7$). The peak area had a good linearity with the sample concentration in three orders of magnitude with correlation coefficients of above 0.9910. The recoveries for 0.05 μg/L of each analyte in tap water were in the range of 57%–140%, and for 5.0 μg/L of each analyte were in the range of 85%–116%. The limits of detection of the method were less than 0.05 μg/L ($S/N=3$) for most PAHs.

Keywords Online solid phase extraction; Polycyclic aromatic hydrocarbons; High performance liquid chromatography; Water analysis

(Received 8 July 2014; accepted 15 October 2014)