

采用全自动在线固相萃取-超高效液相色谱法 测定自来水中的痕量多环芳烃

应用简报

环境

作者

杨新磊, 鲁锐
安捷伦科技(中国)有限公司,
上海, 200080

摘要

本文将传统水样离线固相萃取、富集方法用具有阀切换功能的液相色谱系统代替,建立了采用全自动在线固相萃取-超高效液相色谱联用系统测定自来水中痕量多环芳烃含量的方法。该方法采用大体积进样方式,直接将 2.4 mL 样品加入到在线固相萃取小柱进行浓缩和净化,再将浓缩、净化好的样品在线转移至分析柱进行分离,采用二极管阵列检测器串联荧光检测器进行定量分析。方法灵敏度高,可有效检测自来水样品中低浓度 (ng/L) 多环芳烃。精密度实验结果显示,各多环芳烃保留时间稳定,相对标准偏差小于 0.04%,峰面积相对标准偏差除二苯并[a,h]蒽外均小于 5.0%。除去自来水中本底较高的芴和菲外,自来水样品中低浓度多环芳烃的加标回收率在 90% - 144% 之间。实验结果证明,该方法快速、简单易用、稳定性好、灵敏度高、自动化程度高,可用于自来水样品中痕量多环芳烃的日常监测。

前言

多环芳烃 (PAHs) 是一类具有致畸、致癌和致突变作用的有机化合物,广泛存在于土壤、空气、水体以及各类食品中,已被多个国家和机构列为最严重有机污染物。为严格控制日常饮用水中多环芳烃的含量,美国环保署规定了饮用水中多个多环芳烃的最大污染水平,其中苯并[a]芘的限值是 0.2 $\mu\text{g/L}$ ^[1],世界卫生组织也同样规定了苯并[a]芘的最大准则值为 0.7 $\mu\text{g/L}$ ^[2]。我国《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-2006) 更严格规定了苯并[a]芘的限值为 0.01 $\mu\text{g/L}$,多环芳烃总量不得超过 2 $\mu\text{g/L}$ ^[3]。

由于多环芳烃的低溶解度和对颗粒物的高亲和力,以至于在水中的浓度通常并不高。为了测定水体中痕量的多环芳烃,需要对水样进行高富集倍数的浓缩才能达到仪器的检出限。以高效液相色谱荧光法为例,往往需要将 1 L 或 10 L 的水样进行液液萃取或固相萃取,最后浓缩至 0.1 ~ 0.5 mL 作为进样溶液。这种方式可以很好的满足灵敏度要求,但样品前处

理比较麻烦、耗时较长且对样品的需求量很大。Peter Popp 等^[4]采用自制的微型化搅拌棒以吸附萃取的方式对水样中的多环芳烃进行萃取浓缩, 仅需 10 mL 水样即可达到 0.2 - 2 ng/L 的检出限。然而该方法自动化程度不高, 对于大批量样品来说无法做到高通量自动分析, 很难推广为常规的水质监测方法。近年来, 在线固相萃取联用色谱法^[5-8]被越来越多的用于代替传统离线固相萃取, 广泛用于水质中痕量物质的测定。这种技术自动化程度高、溶剂消耗少且稳定性好, 所需耗材和硬件都基于商品化产品, 一旦方法建立很容易进行推广。本文基于此技术, 建立了采用全自动在线固相萃取-超高效液相色谱系统测定自来水中 16 种痕量多环芳烃的方法。

实验部分

仪器和试剂

全自动在线固相萃取-超高效液相色谱联用系统, 含有:

- 1260 四元泵 (G1311B, 内置四通道脱气机), 用于上样、净化以及在线固相萃取小柱的平衡
- 1290 二元泵 (G4220A, 内置溶剂选择阀和四通道脱气机), 用于分析多环芳烃
- 1260 自动进样器 (G1329B, 改装为 900 μ L 计量泵头, 针座毛细管加装 1.5 mL 不锈钢毛细管), 用于大体积进样, Multidraw 升级号 G1313-68711
- 1260 样品温控模块 (G1330B), 用于控制样品温度, 防止待测物挥发
- 1260 柱温箱 (G1316A, 内置 2 位-6 通阀), 用于控制柱温及阀切换
- 1260 二极管阵列检测器 (G4212B), 用于萘烯的检测

- 1260 荧光检测器 (G1321B), 用于其他多环芳烃的检测
- OpenLab CDS ChemStation 软件 (Rev. C01.07[27]), 用于系统控制及数据处理

流动相在线净化柱: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x 50 mm x 5 μ m (PN 959946-902)

在线固相萃取小柱: Agilent Poroshell 120 SB-C18, 3.0 x 5 mm x 2.7 μ m (PN 823750-912)

分析柱: Agilent Zorbax Eclipse PAH, 3.0 x 50 mm x 1.8 μ m (PN959757-318)

6 mL 样品瓶组件: 瓶身 PN 9301-1377, 瓶盖 PN 9301-1379, 预开口瓶垫 PN 5188-2758

6 mL 样品瓶托盘: 2 个, G1313-44512

EPA 610 多环芳烃混标购自 SUPELCO, 浓度为 100 - 2000 μ g/mL, 溶剂为 MeOH/CH₂Cl₂ = 1/1 (v/v); MeOH、ACN 和 CH₂Cl₂ 为色谱级, 购自 Merck 公司; 水为 MilliQ 纯化水, 18.2 M Ω 。

系统配置及工作原理

系统配置如图 1 所示。实际样品先通过大体积自动进样器进样至在线固相萃取小柱 (柱温箱阀位置 1) 进行水样中多环芳烃的富集, 再用上样泵进行初步净化, 除去保留能力比多环芳烃弱的组分, 此时分析泵处于平衡分析柱状态。完成该过程后, 阀切换至位置 2, 分析泵开始将在线固相萃取小柱上的多环芳烃冲洗至分析柱进行分析, 采用二极管阵列检测器 (DAD) 和荧光检测器 (FLD) 进行测定。完成分析后, 阀切换回位置 1, 对在线固相萃取小柱和分析柱进行平衡, 等待下一次进样分析。

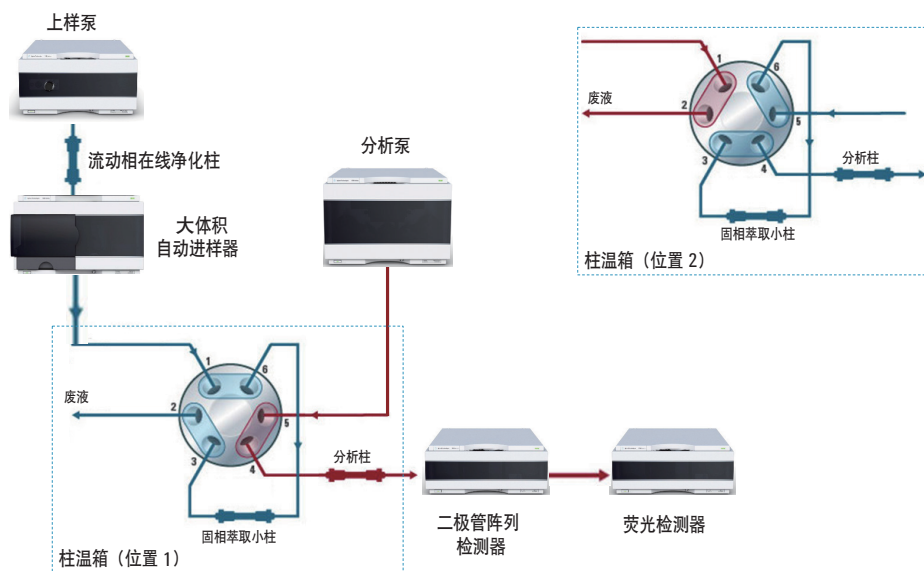


图 1. 全自动在线固相萃取-超高效液相色谱系统配置图

分析条件

进样量: 2.4 mL

抽/推速度: 900 $\mu\text{L}/\text{min}$

柱温箱温度: 30 $^{\circ}\text{C}$

泵参数及阀切换时间: 见表 1

二极管阵列检测器波长: 220 nm

二极管阵列检测器采样频率: 20 Hz

荧光检测器采样频率: 18.52 Hz

荧光检测器增益值: 14

荧光检测器波长切换时间: 见表 2

表 1. 泵参数及阀切换时间表

时间	上样泵			分析泵			阀位置
	水 (%)	甲醇 (%)	流速 (mL/min)	水 (%)	乙腈 (%)	流速 (mL/min)	
0	90	10	0.1	0	100	0.1	1
0.1	90	10	1	-	-	-	
4	-	-	-	0	100	0.1	
4.5	-	-	-	40	60	0.8	
5	0	100	1	-	-	-	
6.5	-	-	-	-	-	-	2
7.5	-	-	-	40	60	0.8	
10	0	100	1	-	-	-	
10.1	90	10	1	-	-	-	
15	90	10	1	0	100	0.8	1
16	90	10	0.1	0	100	0.8	

表 2. 荧光检测器波长切换时间表

时间 (min)	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	其他/备注
0	275	340	萘
9.75	263	330	改变基线: zero 萘、芴
9.9	-	-	改变基线: append
10.5	250	365	菲
10.9	250	400	蒽
11.3	235	460	荧蒽
11.5	235	390	芘
12	270	390	苯并[a]蒽、
13	260	440	苯并[b]荧蒽
13.6	265	415	苯并[k]荧蒽、苯并[a]芘
14.5	295	420	二苯并[a,h]荧蒽
14.9	250	490	茚并[1,2,3-cd]芘

储备液、中间储备液 1、中间储备液 2 和工作溶液制备

将所购多环芳烃混合标样用 MeOH/CH₂Cl₂ 溶液稀释 10 倍作为储备液，各多环芳烃浓度范围为 10 - 200 µg/mL。取 1 mL 该储备液于 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容，摇匀即得中间储备液 1，各多环芳烃浓度范围为 100 - 2000 µg/L。将中间储备液 1 再用甲醇

稀释 100 倍得到浓度范围 1 - 20 µg/L 的中间储备液 2。将中间储备液 2 用甲醇/水 (10/90, v/v) 逐级稀释成不同浓度作为工作溶液，用于绘制标准曲线。各工作溶液中多环芳烃的浓度如表 3 所示。储备液、中间储备液 1 和中间储备液 2 放于 4 °C 冰箱冷藏待用，各工作溶液每次临用前新配。

表 3. 不同工作溶液中各多环芳烃的浓度

化合物	浓度 1 (ng/L)	浓度 2 (ng/L)	浓度 3 (ng/L)	浓度 4 (ng/L)	浓度 5 (ng/L)	中间储备液 2 (µg/L)
萘	10	50	100	500	1000	10
蒽	20	100	200	1000	2000	20
苊	1	5	10	50	100	1
芴	2	10	20	100	200	2
菲	1	5	10	50	100	1
蒽	1	5	10	50	100	1
荧蒽	2	10	20	100	200	2
芘	1	5	10	50	100	1
苯并[a]蒽	1	5	10	50	100	1
蒽	1	5	10	50	100	1
苯并[b]荧蒽	2	10	20	100	200	2
苯并[k]荧蒽	1	5	10	50	100	1
苯并[a]芘	1	5	10	50	100	1
二苯并[a,h]蒽	2	10	20	100	200	2
苯并[g,h,i]芘	2	10	20	100	200	2
茚并[1,2,3-cd]芘	1	5	10	50	100	1

样品制备

直接取自来水样品 90 mL 于 100 mL 容量瓶中，加甲醇定容后，摇匀。另取 90 mL 自来水样品于 100 mL 容量瓶中，加入 1 mL 中间储备液 2 后用甲醇定容、摇匀，该溶液为加标回收溶液。所有样品进样前用 0.45 µm PTFE 滤膜过滤后，放入 6 mL 样品瓶待测。

结果与讨论

流动相在线净化

多环芳烃，尤其是轻质多环芳烃在环境水样以及空气中都有微量存在，为了让测定结果更加准确，需要尽量消除流动相中多环芳烃的本底对结果的影响。在上样过程中，通过降低上样泵流速 (0.1 mL/min) 来减少流动相中痕量物质在在线固相萃取小柱

上的持续富集，同时在上样泵和自动进样器之间加装一根净化柱 (Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6*50 mm*5 µm)。分析泵也设为低流速 (0.1 mL/min)，同时用纯乙腈冲洗分析柱，来消除多环芳烃在分析柱上的富集。

进样体积

多环芳烃在水中的含量极低，为了提高检测灵敏度，传统方法需要用大体积水样进行富集浓缩。按《HJ 478-2009 水质多环芳烃的测定液液萃取和固相萃取高效液相色谱法》^[9] 中方法所述：当萃取样品种类为 2 L，浓缩样品至 0.1 mL，进样量为 10 µL 时，苯并[a]芘的检出限为 4 ng/L，测定下限为 16 ng/L，相当于实际测定了 200 mL 水样中多环芳烃的含量。这么大的样品量对在线固相萃取来说是无法实现的。超高效液相色谱的分析速度和灵敏度都较之常规液相色谱有较大提高，将在固相萃取方式与超高效液

相色谱联用，所需样品量可大幅降低。本文所述方法仅需进样 2.4 mL，即可实现低 ng/L 苯并[a]芘的检出。2.4 mL 水样通过三次进样存储于针座样品环中，然后再一次性切换至在线固相萃取小柱上进行后续净化和富集，进样所需时间约 6 分钟左右。

阀连接方式

在线固相萃取-液相色谱联用时，为减少峰扩散，在线固相萃取小柱上样时流动相流向和洗脱流向往往是相反的（将图 1 阀 4 号孔和 5 号孔对调即可实现）。与超高效液相色谱联用时，由于分析柱产生的压力较高，如果仍然采用上样和洗脱时流动相流向相反的连接方式，对在线固相萃取小柱的使用寿命有很大影响。为延长在线固相萃取小柱寿命，降低实验成本，本文所述方法采用图 1 阀连接方式，让上样和洗脱时流动相流向相同。由于多环芳烃的极性较小，上样时采用低比例有机相，可以保证多环芳烃在固相萃取小柱柱头停留富集，防止峰扩散。如图 2 所示，为采用本文方法测定工作溶液（浓度 4）中多环芳烃所得色谱图，各多环芳烃分离度良好，峰型对称，浓度范围为 50 - 1000 ng/L。

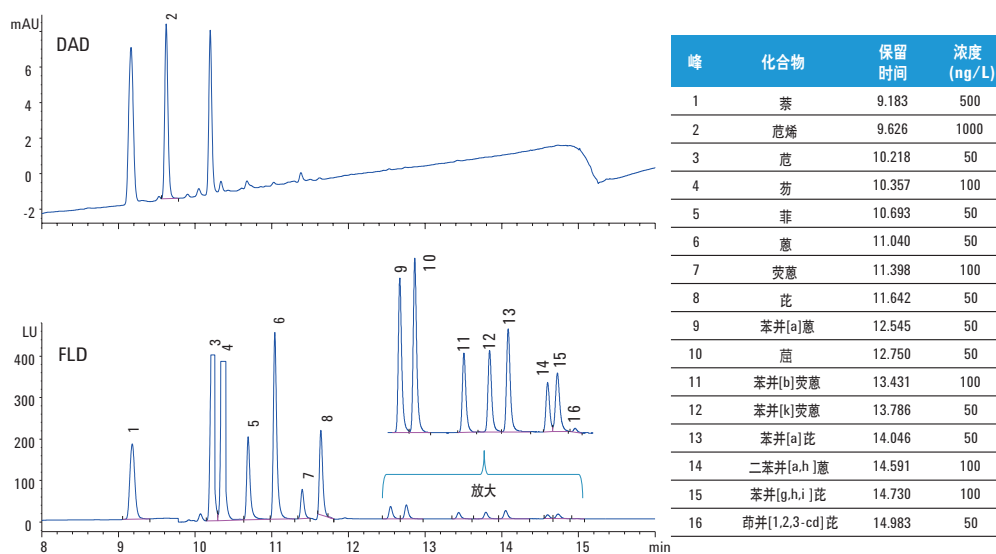


图 2 多环芳烃工作溶液（浓度 4）经在线固相萃取-超高效液相色谱分析所得色谱图

线性范围、检出限和重复性

依次将工作溶液（见表 3）按浓度从低到高进样，每个浓度点进样三次，以不同浓度点为横坐标，以每个浓度点下多环芳烃峰面积的平均值为纵坐标绘制标准曲线，如图 3 所示。由于所购标准品即为混合溶液，每种多环芳烃的浓度不一致，加之各多环芳烃的荧光响应差异很大，导致各多环芳烃的线性范围不同，详见表 4。各多环芳烃在线性范围内，线性相关性良好，除茚并[1,2,3-cd]芘外，各多环芳烃线性相关系数均大于 0.998。由于茚并[1,2,3-cd]芘荧光响应较差，本方法只考察了 50 和 100 ng/L 两个浓度点，线性回归方程采取添加零点方式获得。

由于水样和空气中多环芳烃的普遍存在，尤其是轻质多环芳烃的本底较高，导致大体积进样-在线固相萃取-液相色谱联用方法无法按照 $S/N = 3$ 来计算得到待测物的检出限和定量限。本文以各多环芳烃线性范围最低浓度点的信噪比来考察方法检出限，见表 4。以苯并[a]芘为例，当浓度为 5 ng/L（线性范围最低浓度）时，信噪比为 3.8，该浓度低于我国《生活饮用水卫生标准》中关于苯并[a]芘的限值要求（限值为 10 ng/L）。

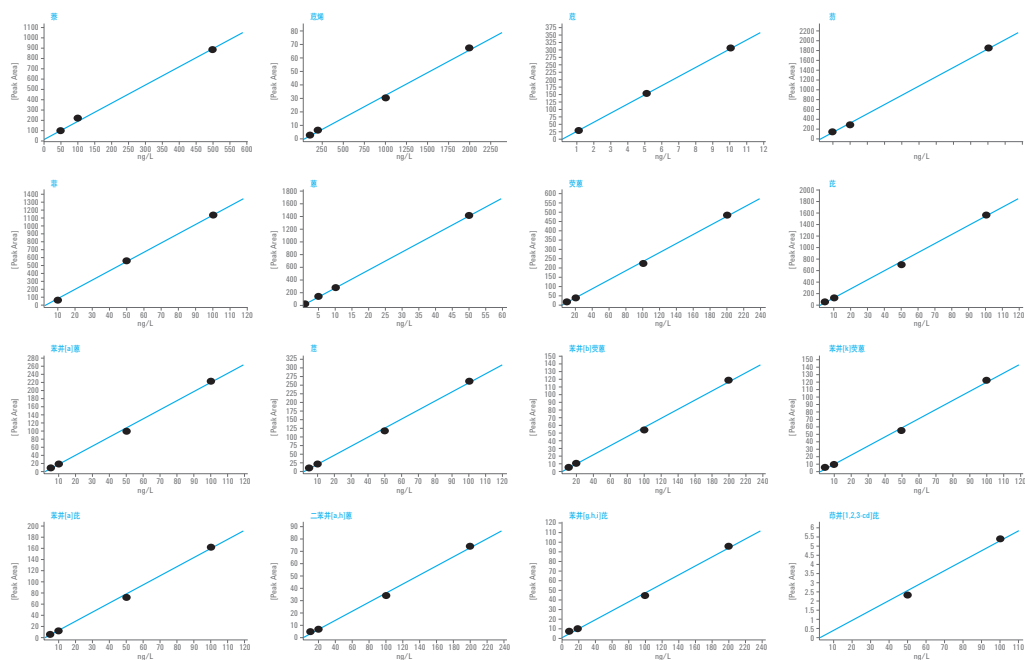


图 3. 16 种多环芳烃的标准曲线

表 4. 多环芳烃线性范围、相关系数及线性范围最低点信噪比

峰	化合物	线性范围 (ng/L)	线性相关系数 (R^2)	线性范围最低点信噪比
1	萘	50-500	0.9988	52.5
2	苊烯	100-2000	0.9984	22.1
3	苊	1-10	0.9999	43.4
4	芴	10-100	0.9993	99.7
5	菲	10-100	0.9992	14.8
6	蒽	1-50	1.0000	33.5
7	荧蒽	10-200	0.9992	13.6
8	芘	5-100	0.9986	10.3
9	苯并[a]蒽	5-100	0.9987	5.3
10	蒽	5-100	0.9989	6.1
11	苯并[b]荧蒽	10-200	0.9991	3.0
12	苯并[k]荧蒽	5-100	0.9987	3.1
13	苯并[a]芘	5-100	0.9986	3.8
14	二苯并[a,h]蒽	10-200	0.9983	2.8
15	苯并[g,h,i]芘	10-200	0.9989	3.8
16	茚并[1,2,3-cd]芘	50-100	0.9971	1.5

采用连续进样 6 针浓度 3 工作溶液的方法进行精密度实验，色谱叠加图、保留时间和峰面积相对标准偏差见图 4。结果显示，各多环芳烃保留时间稳定，相对标准偏差小于 0.04%，峰面积相对标准偏差除二苯并[a,h]蒽外，均小于 5.0%。

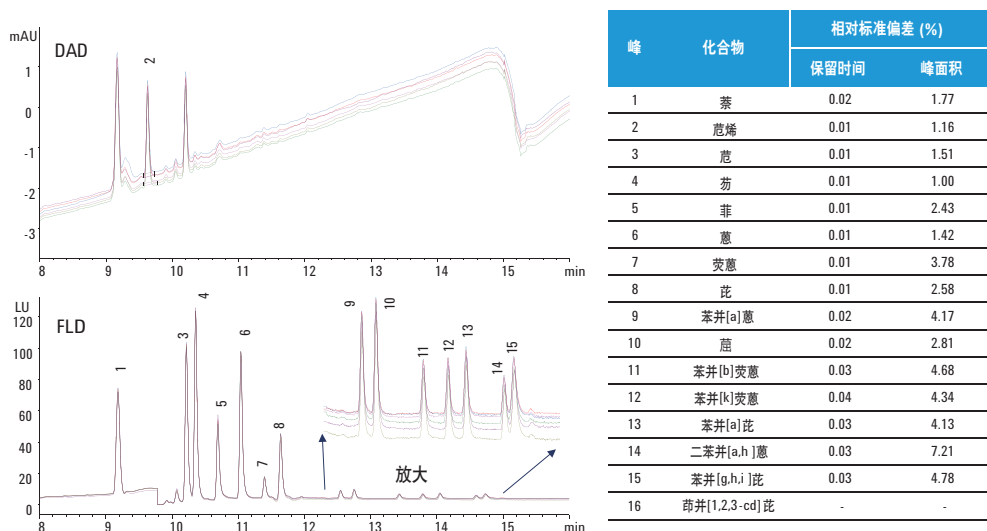


图 4. 浓度 3 工作溶液连续进样 6 次所得色谱叠加图、保留时间和峰面积相对标准偏差

实际样品测定结果及加标回收率

取自来水样品和自来水加标样品，分别进样 3 次，计算多环芳烃平均值。如图 5 所示，蓝色为自来水样品色谱图，红色为自来水加标色谱图，图中表格分别列出了自来水中所测多环芳烃含量以及加标回收率数据。其中，菲和芴由于自来水中含量较高且菲的加标浓度低于线性范围最低点，导致两者加标回收率较低，芴为 57.29%，菲只有 32.61%。二苯并[a,h]蒽加标回收率偏高，原因未知。茚并[1,2,3-cd]比由于加标浓度远低于线性范围最低点，无加标回收率数据。

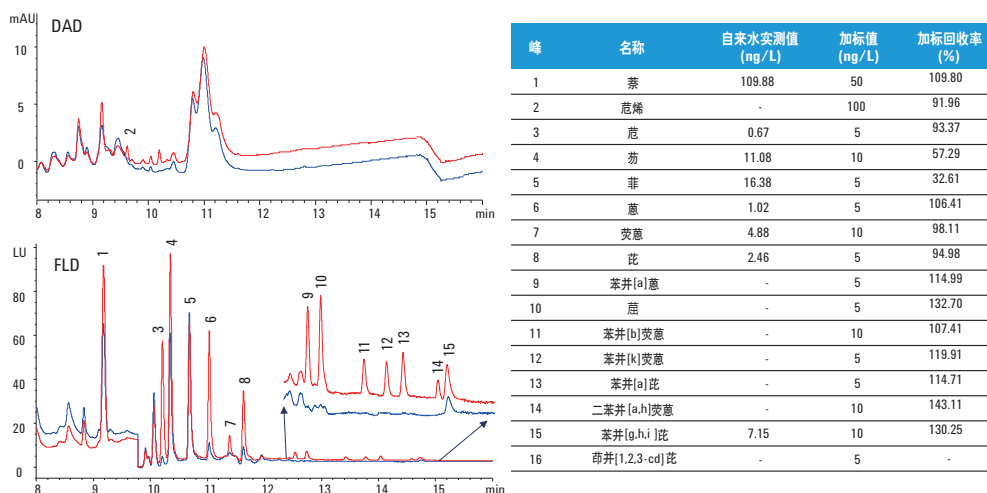


图 5 自来水样品及自来水加标样品色谱图和回收率（蓝色为样品，红色为加标样品）

结论

本文建立了采用在线固相萃取-超高效液相色谱联用系统测定自来水中痕量多环芳烃的方法，大大简化了传统固相萃取需要大量人工参与的操作，采用色谱泵、进样器和切换阀实现实际样品的上样、浓缩和净化，并且可以将样品在线转移至分析流路进行分离定量。采用超高效液相色谱系统，只需较小的进样量即可达到低至 ng/L 浓度的灵敏度。实验数据表明，该方法稳定性好、自动化程度高，自来水样品只需加入 10% 甲醇进行定容、过滤后即可上机测定，是一种非常简单易用的水中痕量多环芳烃监测方法。

参考文献

- [1] The Drinking Water Standards and Health Advisories, United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2011
- [2] Guidelines for Drinking-water Quality (Forth Edition), World Health Organization (WHO)
- [3] 生活饮用水卫生标准, GB 5749-2006
- [4] Peter Popp, Coretta Bauer and Luise Wennrich. Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Analytica Chimica Acta*, 2001(436): 1-9
- [5] Lubov Oliferova, Mikhail Statkus, Grigoriy Tsyisin, Oleg Shpigun and Yury Zolotov. On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents, *Analytica Chimica Acta*, 2005(538): 35-40
- [6] Cesar E. Ramirez, Chengtao Wang and Piero R. Gardinali. Fully automated trace level determination of parent and alkylated PAHs in environmental waters by online SPE-LC-APPI-MS/MS, *Anal Bioanal Chem*, 2014(406): 329-344
- [7] 安捷伦应用简报, 利用在线固相萃取富集方法对水中农药进行高灵敏度检测, 2012
- [8] Agilent Application Note, High Volume Injection up to 5 mL with the Agilent 1200 Infinity Series Online SPE Solution for Highest Sensitivity, 2013
- [9] 水质多环芳烃的测定 液液萃取和固相萃取高效液相色谱法, HJ 478-2009

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

安捷伦科技大学:

<http://www.lasca-china.com.cn/agilent>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊:

www.agilent.com/chem/accessagilent-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2015

2015年10月1日, 中国印制

5991-6375CHCN



Agilent Technologies