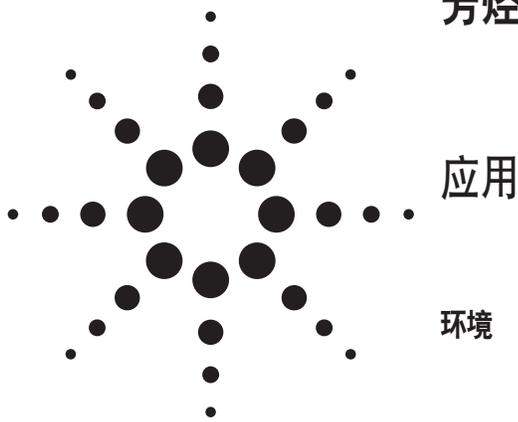


用 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱分析水中多环芳烃 (PAH)



作者

Rongjie Fu 傅荣杰、Yun Zou 邹云
安捷伦科技公司
英伦路 412 号
上海市浦东新区, 200131
中国

摘要

多环芳烃 (PAH) 作为烟草、焦油、燃料等不完全燃烧的产物, 是环境中常见的致癌物质。因此有许多法规都用于分析例如空气、水、土壤和食品中的这些化合物。由于水中 PAH 含量极低, 需要一种高灵敏度的方法。本文介绍了一套完整的用于分析水中 PAH 的高效液相色谱 (HPLC) 方法, 并使用最近开发的 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱和 AccuBond ODS C18 固相萃取 (SPE) 柱来萃取水样。优化了 C18 键合相的 Eclipse PAH 具有极好的重现性, 可以作为常规分析方法的理想的色谱柱。

引言

多环芳烃 (PAH) 在环境中普遍存在。自然产生和人为产生的 PAH 有类似的成因。最新研究证实了很多 PAH 会致癌、具有诱变性以及导致畸形。因此, PAH 成为所有环境组织都密切关注的化合物, 为保护人类的健康, 其在水中的含量是受到严格限制的 [1]。

“多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons)” 这个术语也用于表示这些化合物。现在, 其缩写形式 PAH 已广泛用于指代此类化合物。需要控制的 PAH 是指被美国国家环保局 (EPA) 指定为需要进行监管的“主要污染物”——16 种 PAH, 美国国家环保局要求对污水 (610[2])、饮用水 (550.1[3]) 和固体废弃物 (8310[4]) 中的这 16 种化合物不仅仅是定性, 而是进行定量分析。

而美国国家职业安全健康研究所 (NIOSH) 发布的 Method 5506[5] 中则包括 17 种 PAH。表 1 列出了这 17 种化合物和它们的一些性质。



表 1[5]. NIOSH Method 5506 PAH 分子式和物理性质

化合物 (按分子量排列)	分子式	分子量	熔点 (°C)	沸点 (°C)	水中溶解度 mg/L (25 °C)
1 萘	C ₁₀ H ₈	128.17	80.2	218	30
2 蒽	C ₁₂ H ₈	152.20	92.5	280	3.9
3 芘	C ₁₂ H ₁₀	154.21	93.4	279	3.9
4 芴	C ₁₃ H ₁₀	166.22	115	295	2
5 葱	C ₁₄ H ₁₀	178.23	215	340	0.07
6 菲	C ₁₄ H ₁₀	178.23	99.2	340	1.2
7 荧葱	C ₁₆ H ₁₀	202.26	108	384	0.26
8 蒽	C ₁₆ H ₁₀	202.26	151	404	0.13
9 苯并[a]葱	C ₁₈ H ₁₂	228.29	167	435	0.01
10 蒽	C ₁₈ H ₁₂	228.29	258	448	0.002
11 苯并[b]荧葱	C ₂₀ H ₁₂	252.32	168	—	0.014
12 苯并[k]荧葱	C ₂₀ H ₁₂	252.32	217	480	0.008
13 苯并[a]蒽	C ₂₀ H ₁₂	252.32	177	495	0.004
14 苯并[e]蒽	C ₂₀ H ₁₂	252.32	178	311	—
15 苯并[g,h,i]花	C ₂₂ H ₁₂	276.34	278	—	—
16 茚并[1,2,3-cd]蒽	C ₂₂ H ₁₂	276.34	164	—	0.0005
17 二苯并[a,h]葱	C ₂₂ H ₁₄	278.35	270	524	0.00026

“—”表示无。

实验

仪器

Agilent 1200 SL 型高分离度快速液相色谱系统, 该系统包括以下组件:

G1312B	SL 型二元泵
G1379B	微量真空脱气机
G1367C	高性能多孔板自动进样器 (WPS), 配有 54 x 2 mL 样品盘
G1316B	SL 型柱温箱(TCC)
G1315C	SL 型二极管阵列检测器 (DAD), 配有标准流通池
G1321A	荧光检测器 (FLD)

连接仪器的所有管线内径为 0.17 mm。

其他仪器 (例如 1100 二元系统, 1100 和 1200 四元泵系统) 也可运行此方法, 但在此不作评价。使用其他仪器时, 可能需要对梯度进行细微调整。

HPLC 条件

色谱柱:	ZORBAX Eclipse PAH, 4.6 mm x 150 mm, 3.5 μm (安捷伦部件号 959963-918)
流动相:	A 水; B 乙腈
梯度时间表:	时间 (min) %B (乙腈)
	0.0 50
	2.0 50
	22.0 100
	停止时间 28 min, 后运行 5 min
流速:	1.5 mL/min
二极管阵列检测器:	PW 0.1 min; slit 4 nM; Standard Flow Cell
信号 A:	254, 4 nm; Ref 关闭
荧光检测器:	
时间表:	PMT=12
	时间 (min) Ex(nm) Em(nm)
	0 220 330
	7 210 330
	9.6 250 363
	10.7 250 405
	12 250 460
	13 270 400
	20.2 270 415
	24.3 250 490

标准溶液

EPA 610 的 PAH 混合标样和单个苯并[e]芘标样从 SUPELCO (Bellefonte, PA, USA) 获得。将 0.9 mL

表 2. 储备液中 PAH 标样的浓度

化合物 (按分子量排列)	浓度 (µg/mL)
1 萘	900
2 蒽	1800
3 芘	900
4 苊	180.1
5 葱	90.2
6 菲	90.1
7 荧蒽	180
8 芘	89.9
9 苯并[a]葱	89.9
10 蒽	90.2
11 苯并[b]荧蒽	180
12 苯并[k]荧蒽	89.9
13 苯并[a]芘	90.1
14 苯并[e]芘	125
15 苯并[g,h,i]芘	179.9
16 茚并[1,2,3-cd]芘	90.1
17 二苯并[a,h]葱	179.9

EPA 610 混合物与 0.1 mL 1.25 mg/mL 苯并[e]芘混合，作为储备液。表 2 给出了 PAH 储备液的浓度组成。用乙腈稀释储备液制备用于校正曲线的标样。校正曲线采用了五个浓度。

样品制备

要分析水中的痕量 PAH，使用 AccuBond ODS C18 SPE 小柱（安捷伦部件号 188-1356）萃取 1 L 水。萃取柱 (0.5 g) 依次用四份 10 mL 二氯甲烷 (DCM)、甲醇和两份 10 mL 水（HPLC 级）进行预处理。

接着使用自动固相萃取器将 1 L 水样以 2.5 mL/min 的流速通过 SPE 小柱。然后用 10 mL HPLC 水冲洗萃取柱。用氮气吹扫 SPE 柱约 10 min 将其吹干。然后，用两份 5 mL DCM 将 PAH 样品从柱上洗脱，合并洗脱液。用氮气将洗脱液吹干至体积为 1 mL，然后加入 3.0 mL 乙腈，再将其浓缩至体积为 1.0 mL [3]。

结果与讨论

分离与检测

在此应用中，17 种 PAH 均可在 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱上得到基线分离。图 1 和图 2 显示了分别使用二极管阵列检测器和荧光检测器在该色谱柱上获得的 17 种 PAH 的色谱图。混合物包含五组异构体（第一组 5 和 6；第二组 7 和 8；第三组 9 和 10；第四组 11、12、13 和 14；第五组 16 和 17）。其中有些无法在其他反相色谱柱或 PAH 柱上得到基线分离。Eclipse PAH 色谱柱是一种独特键合相的色谱柱，专门为分离这些异构体而设计。最接近的峰（例如峰 3 和 4、峰 11 和 12）的分离度均大于 2.0。

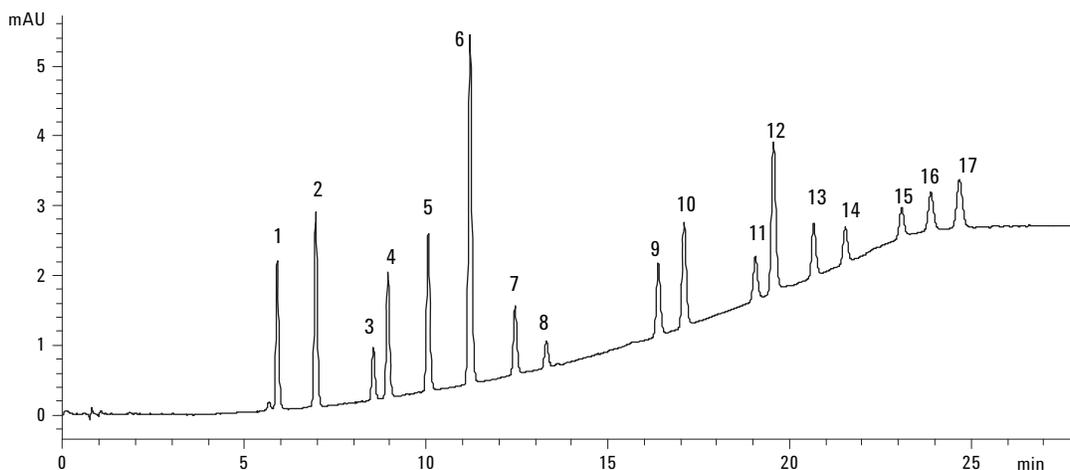


图 1. Eclipse PAH 上分离的 17 种 PAH，4.6 mm x 150 mm，3.5 µm（部件号 959963-918），二极管阵列检测器 254 nm

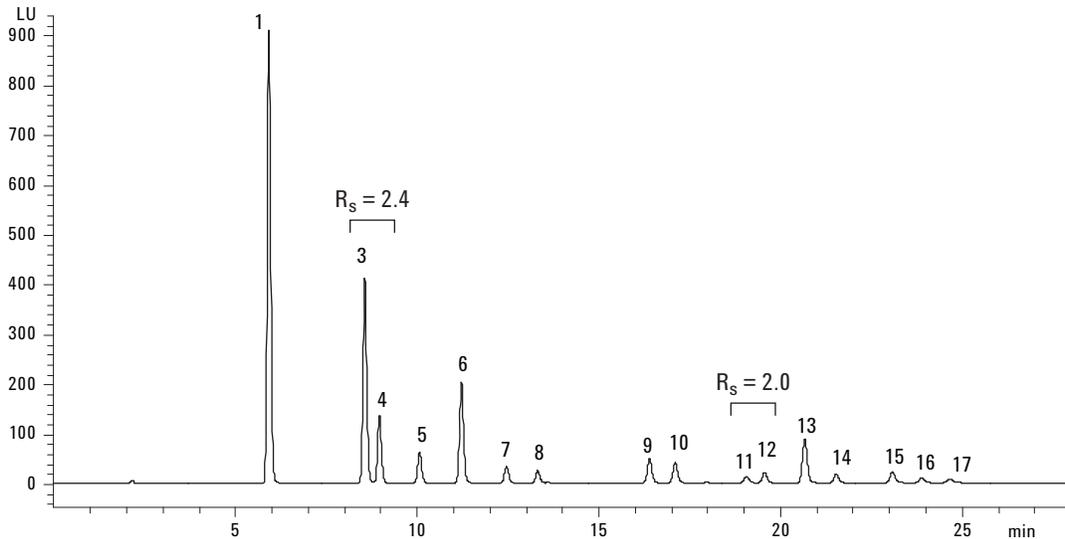


图 2. Eclipse PAH 上分离的 17 种 PAH, 4.6 mm x 150 mm, 3.5 μm (部件号 959963-918), 荧光检测器

在该方法中，我们使用了二极管阵列检测器和荧光检测器。荧光检测灵敏度更高，建议用于 PAH 的痕量分析。所有 PAH 都有其自己最佳的激发和发射波长。为获得最高的灵敏度，使用了荧光检测程序，可以获得最低为皮克级的检测限 (LOD)。与使用紫外吸收相比，分析物信噪比大约高了 100 倍，因此，LOD 大约是紫外检测的 1/100。表 3 中显示了在信噪比为 3 的条件下，计算的 FLD 和 DAD 的 LOD 数据。

表 3. 17 种 PAH 分别在 FLD 和 DAD 上的 LOD 理论值(信噪比 = 3)

化合物 (按洗脱顺序)	LOD (FLD) (pg)	LOD (DAD) (pg)
1 萘	1.93	196.6
2 蒽	—	521.1
3 芘	2.64	936.3
4 苊	2.13	774.5
5 菲	0.54	31.5
6 蒽	0.14	16.0
7 荧蒽	0.62	150.0
8 芘	0.24	189.8
9 苯并[a]蒽	0.69	56.5
10 苊	0.80	41.9
11 苯并[e]芘	2.18	133.2
12 苯并[b]荧蒽	2.35	55.8
13 苯并[k]荧蒽	0.17	72.6
14 苯并[a]芘	0.38	117.0
15 二苯并[a,h]蒽	2.11	202.1
16 苯并[g,h,i]芘	1.89	206.5
17 茚并[1,2,3-cd]芘	1.69	87.0

对于高度污染的样品，二极管阵列检测除可以准确定量外，还可提供其他分析数据，例如峰一致性和峰纯度确认。另外，蒽不发射荧光，所以此类化合物也需要采用紫外检测。在许多法规中，紫外线 254 nm 用于所有 PAH 化合物的检测，但对于有些 PAH 化合物来说，254 nm 不一定是理想的检测波长。在一些论文中，采用 DAD 波长转换程序来获得最佳的信噪响应 [6]。

重现性和线性

稳定的保留时间 (RT) 对于从复杂的环境基质中正确识别分析物非常重要。当使用时间可编程荧光检测器时，稳定的保留时间对于在分析过程中设置波长转换也非常重要。峰面积的精度对于获得可靠的定量数据同样十分重要。

表 4 列出了典型的 RT 精度 (优于 0.1%)，这是通过使用 Eclipse PAH 色谱柱进行了 10 次 PAH 分析获得的。通过 FLD 和 DAD 获得的峰面积精度低于 2% 相对标准偏差 (RSD)。

Eclipse PAH 色谱柱的性能以及 1200 SL 型仪器的可靠性提供了这些高质量的结果。新的 Eclipse PAH 色谱柱与其他 Eclipse Plus 色谱柱一样采用的是一种新的高纯度硅胶，因此对于所有样品类型 (包括 PAH 样品)，均可获得最佳峰形和最高的柱效及优异的重现性。

表 4. Eclipse PAH, 4.6 mm x 150 mm, 3.5 μm 色谱柱上的峰面积重现性和保留时间重现性

化合物 (按洗脱顺序)	DAD 面积 RSD (%) (N = 10)	FLD 面积 RSD (%) (N = 10)	DAD RT RSD (%) (N = 10)	FLD RT RSD (%) (N = 10)
1 萘	0.39	0.70	0.04	0.07
2 蒽	0.44	—	0.06	—
3 苊	0.56	0.84	0.05	0.05
4 芴	0.61	0.77	0.05	0.05
5 菲	0.47	0.45	0.04	0.11
6 蒽	0.57	0.27	0.04	0.04
7 荧蒽	0.67	0.45	0.03	0.04
8 芘	1.44	0.27	0.03	0.02
9 苯并[a]蒽	0.48	0.36	0.09	0.02
10 蒽	0.41	0.30	0.02	0.02
11 苯并[e]芘	1.15	0.29	0.02	0.02
12 苯并[b]荧蒽	0.42	0.41	0.01	0.02
13 苯并[k]荧蒽	0.74	0.47	0.01	0.02
14 苯并[a]芘	1.41	0.98	0.009	0.02
15 二苯并[a,h]蒽	1.02	0.39	0.007	0.01
16 苯并[g,h,i]芘	1.12	0.89	0.01	0.01
17 茚并[1,2,3-cd]芘	0.75	0.39	0.008	0.01

请注意，图 3 显示了苯并[a]芘的线性图（范围从 0.011 ng 到 0.18 ng，相关系数为 0.99990）。而表 5 中列出的分别在 DAD 和 FLD 上的线性相关系数，每个 PAH 的相关系数都很好，非常接近 1.00。为饮用水中痕量的 PAH 的定量给出了良好的线性和范围。

表 5. Eclipse PAH 色谱柱分别在 DAD 和 FLD 上的线性相关系数

化合物 (按洗脱顺序)	DAD 线性相关系数 (r2)	线性范围 (ng)	FLD 线性相关系数 (r2)	线性范围 (ng)
1 萘	0.9999	1.76 – 56.25	0.9999	0.11-1.76
2 蒽	0.9999	3.52 – 112.5	—	—
3 苊	0.9999	1.76 – 56.25	0.9998	0.22 – 3.52
4 芴	0.9999	3.52 – 112.5	0.9993	0.11 – 1.76
5 菲	0.9999	0.18 – 5.63	0.9998	0.22 – 3.52
6 蒽	0.9999	0.18 – 5.64	0.9998	0.011 – 0.176
7 荧蒽	0.9999	0.35 – 11.25	0.9999	0.011 – 0.176
8 芘	0.9990	0.35 – 11.25	0.9999	0.022 – 0.352
9 苯并[a]蒽	0.9998	0.18 – 5.62	0.9999	0.011 – 0.176
10 蒽	0.9999	0.18 – 5.64	0.9999	0.011 – 0.176
11 苯并[e]芘	0.9993	0.49 – 15.62	0.9999	0.011 – 0.176
12 苯并[b]荧蒽	0.9999	0.35 – 11.25	0.9999	0.015 – 0.244
13 苯并[k]荧蒽	0.9994	0.35 – 11.25	0.9999	0.022 – 0.352
14 苯并[a]芘	0.9994	1.41 – 45.0	0.9999	0.011 – 0.176
15 二苯并[a,h]蒽	0.9993	0.70 – 22.5	0.9999	0.022 – 0.352
16 苯并[g,h,i]芘	0.9990	0.70 – 22.5	0.9996	0.022 – 0.352
17 茚并[1,2,3-cd]芘	0.9994	0.35 – 11.25	0.9996	0.011 – 0.176

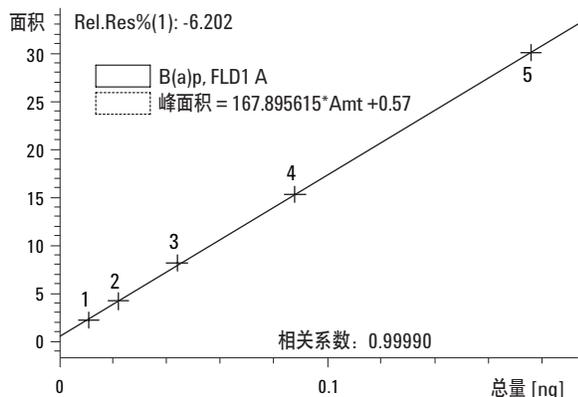


图 3. 通过 FLD 程序获得的苯并[a]芘的线性图

回收率

表 6 显示了基于 1L HPLC 水样中添加 10 μL 标准储备液的回收率结果。根据“样品前处理”中描述的步骤制备回收样品。考虑到 PAH 在水中溶解度较低，尤其是后洗脱化合物，因此通常在添加了标样的水中使用有机溶剂改性剂（例如甲醇、异丙醇、四氢呋喃或它们的混合物）。本方法中使用了 20% 甲醇用作有机溶剂改性剂。化合物 2、3、4、5、6 和 7 的回收率在 85% 以上，但化合物 1、10、11、12、13、15、16 和 17 则没有那么高，而是在 35% 到 49% 之间。

化合物萘具有挥发性，在使用氮气吹扫进行浓缩时导致回收率较低；由于后洗脱化合物的溶解度低，即使在水中添加了 20% 甲醇，它们的回收率依然比较低。

为提高挥发性萘的回收率，可以使用一种管式加热器浓缩技术进行浓缩，并将 ODS-C18 的 DCM 洗脱液转换为乙腈 [1]。

实际样品

图 4 显示了多种水样（包括试剂水、饮用水、自来水和河水）的色谱图。每种水样添加了 40 μL 1/640 储备液，其中苯并[a]芘浓度为 0.225 ppb。所有添加的标样都能被检测到并且得到良好地分离。在先前的研究中，我们使用的梯度时间较短，为 18 min，所有标样也都进行了基线分离，但实际样品中在 13 和 14 之间存在干扰峰。为分离这个干扰峰，梯度时间增加到了 22 min。在研究中，此条件下，没有在 HPLC 纯水中找到目标 PAH，因此将这种水认为是空白水。最上面的色谱图是添加了标样的试剂水（HPLC 纯水）。我们在一些自来水样中发现了痕量的萘。使用 FLD，在一些河水样品中检测到少量的化合物萘、芘、菲、蒽、荧蒽、芘、苯并[a]蒽。

表 6. 17 种 PAH 的回收率数据 (n = 3)

化合物 (按洗脱顺序)	FLD 回收率 (%)	RSD (%)	DAD 回收率 (%)	RSD (%)
1 萘	42.6	1.48	44.0	5.9
2 萘烯	—	—	97.1	5.3
3 芘	97.2	4.38	95.7	4.4
4 芘	100.6	5.5	100.4	6.1
5 菲	95.4	5.11	101.6	5.6
6 蒽	88.3	3.73	90.9	4.7
7 荧蒽	94.1	3.60	92.4	4.5
8 芘	88.4	4.30	83.5	2.4
9 苯并[a]蒽	61.6	1.74	60.3	5.8
10 蒽	48.0	2.99	48.9	6.1
11 苯并[e]芘	40.1	4.97	40.4	12.8
12 苯并[b]荧蒽	48.7	2.06	48.8	3.4
13 苯并[k]荧蒽	42.0	3.81	45.8	1.7
14 苯并[a]芘	58.8	3.59	57.6	10.0
15 二苯并[a,h]蒽	39.1	6.36	35.2	11.1
16 苯并[g,h,i]芘	39.2	2.34	45.6	4.8
17 茚并[1,2,3-cd]芘	46.7	1.57	39.8	6.8

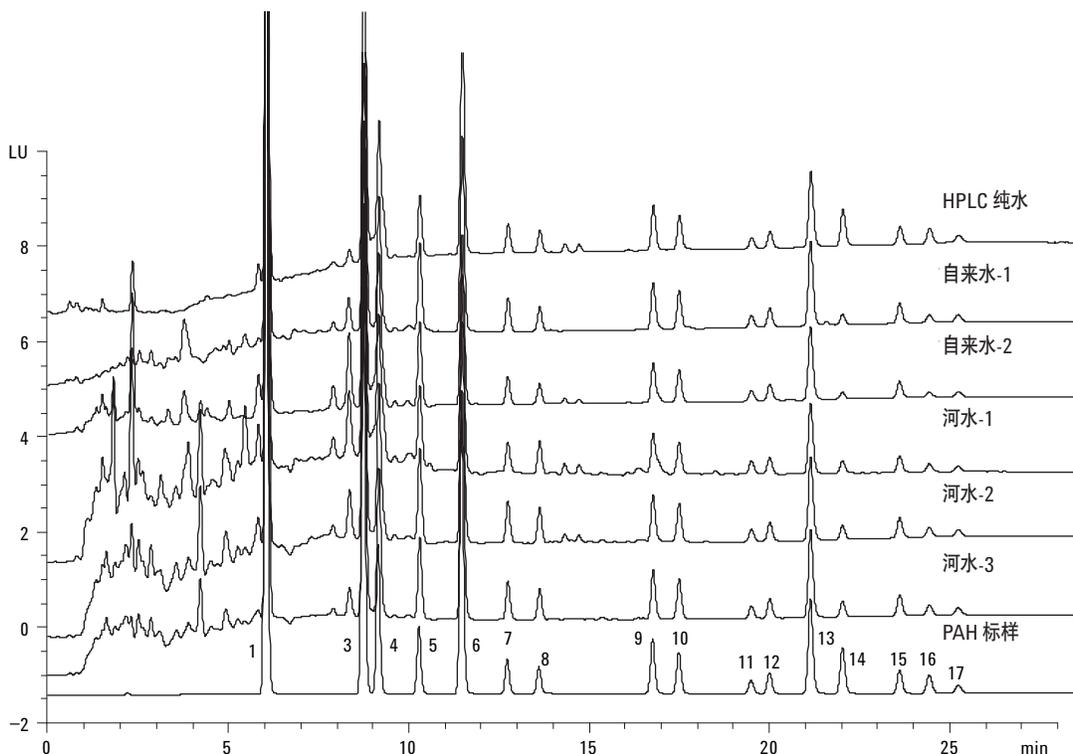


图 4. Eclipse PAH 色谱柱分析添加了 PAH 标样的多种水样

结论

使用新的 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱，所有 17 种 PAH 均得到了基线分离，并且最靠近的两个分析物的分离度也大于 2.0。在河水和饮用水样品中，所有添加的 PAH 可以与干扰物分离。线性极佳；平均峰面积重现性好，RSD% 低于 1.5%，平均保留时间重现性 RSD% 低于 0.1%。使用 AccuBond ODS C18 得到的回收率与法规规定的基本一致。通过进一步优化样品前处理过程，可能会获得更好的结果，但本文中未做研究。使用 FLD 程序检测可获得低皮克级 LOD。对于除了芘烯（不发射荧光）以外所有 PAH，本应用中的 FLD 设置给出了最佳信噪比。

Eclipse PAH 色谱柱的性能极佳，对于 PAH 的分析柱效高且具有独特的选择性，因此对于实际水样中痕量 PAH 分析可以获得高灵敏度。

参考文献

1. Harry Prest, "Solid-Phase Extraction and Retention-Time Locked GC/MS Analysis of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)" Agilent Technologies publication, 5988-7150EN (2002).
2. United States Environmental Protection Agency, "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Municipal and Industrial Wastewater," *Method 610*, 1982, EPA Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268.
3. United States Environmental Protection Agency, "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection," *Method 550.1*, 1990, EPA Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268.

4. United States Environmental Protection Agency, "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Ground Water and Wastes," *Method 8310*, 1986, EPA Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of Research and Development, Cincinnati, Ohio 45268.
5. National Institute for Occupational Safety and Health Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by HPLC, *Method 5506*, Issue 3, 1998, Washington DC 20201.
6. Sun, Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Liquid Chromatography with Solid Phase Extraction (II), *J. of University of Science and Technology of Suzhou*, 19(4): 43-48 (2006).

更多信息

要了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和性能指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技，2008

中国印刷
2008年2月14日
5989-7953CHCN

