

Анализ полициклических ароматических углеводородов в почве с применением Agilent Bond Elut ВЭЖХ с ФЛД

Методическая информация

Экологический контроль

Авторы

Белла О. Пьюл, Лесего С. Ммюлефе,
Нельсон Торто
Университет Родса
Химический факультет
P. O. Box 94, Grahamstown 6140
South Africa (ЮАР)

Аннотация

Разработана и аттестована для определения шестнадцати полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в почве методика на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентным детектором (ФЛД). Анализируемые ПАУ включают нафталин (Nар), аценафтилен (Асу), аценафтен (Асе), флуорен (Flu), фенантрен (Phe), антрацен (Ant), флуорантен (Flн), пирен (Pyr), 1,2-бенза[а]антрацен (BaA), хризен (Chr), бензо[е]пирен (BeP), бензо[е]аценафтилен (BaA), бензо[к]флуорантен (BkF), дибензо[а,h]антрацен (DahA), бензо[g,h,i]перилен (BghiP) и индено[1,2,3-cd]пирен (InP). Методика использует пробоподготовку с использованием процедуры QuEChERS («быстро», «просто», «экономично», «эффективно», «надежно» и «безопасно») для анализа остаточных количеств многих веществ, созданной на основе официального метода экстракции и очистки 2007.01 Ассоциации аналитических сообществ (АОАС). Разделение определяемых веществ проводилось на колонке Agilent ZORBAX Eclipse PAH (4,6 x 50 мм, 1,8 мкм) путем градиентного элюирования бинарной смесью ацетонитрил — вода с последующим флуоресцентным детектированием, для которого задавались соответствующие длины волн возбуждающего и измеряемого испускаемого излучения. Найденное содержание аналитов находилось в диапазоне от 86,0 до 99,2 % от истинного при относительном стандартном отклонении (RSD) от 0,6 до 1,9 % для трех различных уровней насыщения образца аналитами. Пределы обнаружения и количественного определения составили соответственно от 0,005 до 0,78 и от 0,02 до 1,6 нг/г.



Agilent Technologies

Введение

Полиароматические углеводороды или полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются ароматическими веществами с конденсированными циклами, которые классифицируются по числу углеродных циклов, а также по канцерогенному действию. Би- и трициклические ПАУ не канцерогенны, а некоторые из тетра-, пента- и гексациклических ПАУ канцерогенны. Тетрациклические ПАУ хризен и бензо[а]антрацен, пентациклические ПАУ бензо[а]пирен, бензо[б]флуорантен, бензо[к]флуорантен и дибензо[а, h]антрацен и гексациклический ПАУ индено[1,2,3-сd]пирен являются канцерогенными ПАУ. Среди ПАУ наиболее выраженными канцерогенными свойствами обладает бензо[а]пирен [1]. Агентство по охране окружающей среды США (EPA) и Евросоюз классифицируют шестнадцать из таких ПАУ как опасные соединения [2]. В целом ПАУ являются липофильными соединениями, демонстрирующими высокое сродство к органическим веществам, и их определение в почве всегда требует применения эффективных экстракционных методик, чтобы извлечь эти сильно сорбирующиеся загрязняющие вещества из почвы [3]. Был исследован ряд методик экстракции для пробоподготовки образцов почвы (экстракция по методу Сокслета, жидкость — жидкостная экстракция и ТФЭ) была необходима стадия выпаривания, что приводило к потерям или занижению содержания летучих ПАУ, таких как нафталин [4].

Метод AOAC QuEChERS широко применялся при анализе пестицидов в пробах пищевых продуктов со времени его разработки учеными Министерства сельского хозяйства США (USDA) [5]. Недавно эта методика распространилась

на новые области применения, помимо исследования безопасности пищевых продуктов. В целом она включает два основных этапа: экстракцию и очистку с помощью дисперсионной ТФЭ. В ней используется одностадийная экстракция с помощью забуференного ацетонитрила с одновременным высаливанием воды из водной пробы с помощью безводного сульфата магния ($MgSO_4$), чтобы вызвать разделение жидких фаз. После отбора аликвоты из органического слоя для дальнейшей очистки осуществляют дисперсионную твердофазную экстракцию (дТФЭ) с использованием сочетания сорбента на основе первично-вторичного амина (ПВА) для отделения органических кислот от других компонентов и безводного сульфата магния $MgSO_4$ с целью снижения остаточного количества воды в экстракте. Могут добавляться и другие сорбенты, такие как графитированная сажа (GCB), чтобы удалить пигменты и стерин, или C18, чтобы удалить жиры и воски.

В данной методической информации представлены сведения о методе анализа ПАУ в следовых количествах с использованием метода ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием (ФЛД). Методики на основе ВЭЖХ применимы для анализа ПАУ, так как детектирование по УФ-поглощению и флуоресцентное детектирование обеспечивают повышенную селективность по сравнению с другими методиками, такими как ГХ с пламенно-ионизационным детектором [6]. Метод включает пробоподготовку с использованием набора для экстракции с буферными солями Bond Elut AOAC (кат. № 5982-5755) и набора для дисперсионной ТФЭ содержащих жирные вещества проб Bond Elut AOAC с пробирками на 15 мл (кат. № 5982-5158). Химические структуры ПАУ, задействованных в данном исследовании, приведены на рис. 1.

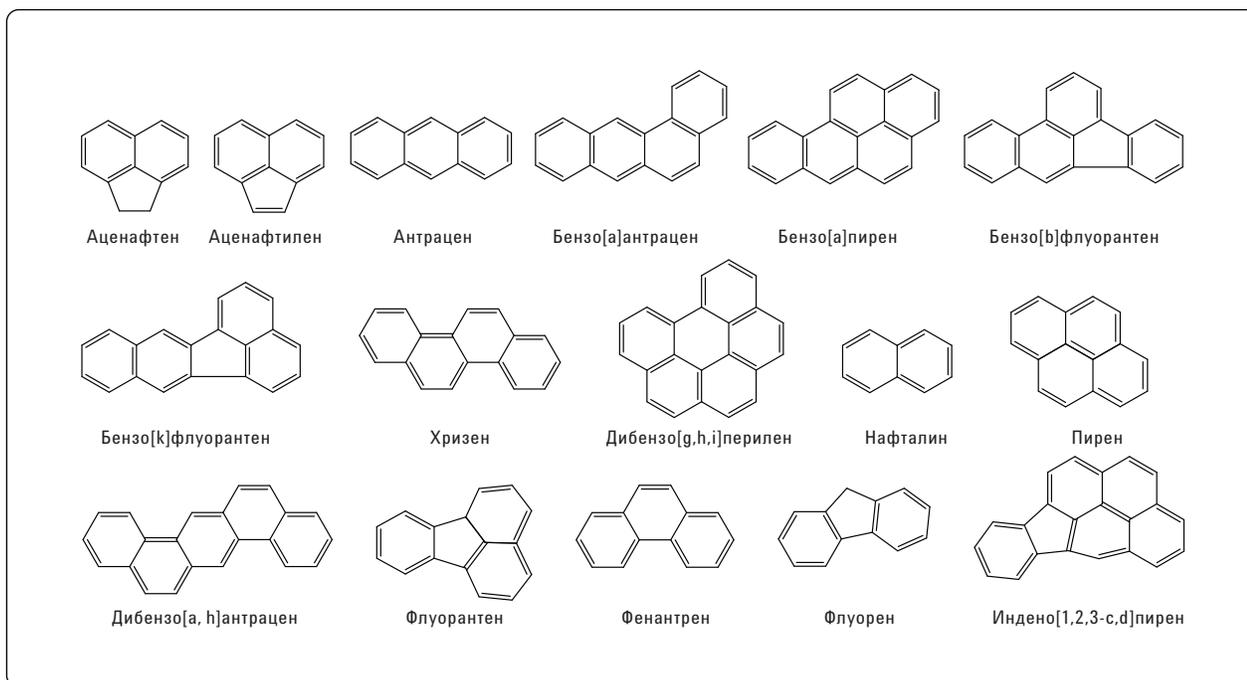


Рис. 1. Химические структуры полициклических ароматических углеводородов, использованных в исследовании

Экспериментальная часть

Реагенты и растворители

Все реагенты характеризовались степенью чистоты «чистый для анализа» или «для ВЭЖХ». Ацетонитрил (CH_3CN) и ПАУ были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США). Используемая вода была получена на системе Milli-Q (Милфорд, Массачусетс, США). Подвижная фаза фильтровалась через мембранный фильтр Whatman (диаметр: 47 мм, размер пор: 2 мкм).

Стандартные растворы

Маточные стандартные растворы (1 мг/мл) получали путем растворения 10 мг соответствующего ПАУ в 10 мл CH_3CN и хранили при -20°C . Все рабочие растворы ежедневно приготавливали заново путем последовательного разведения CH_3CN .

Оборудование и материалы

Анализ выполнялся с использованием системы ВЭЖХ Agilent серии 1200 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США), оборудованной бинарным насосом и флуоресцентным детектором (ФЛД), для которого задавались соответствующие длины волн возбуждения и испускания (табл. 1). Выбор длин волн возбуждения и испускания для флуоресцентного детектирования основывался на оптимальном отклике для того или иного ПАУ. Так как аценафтилен не флуоресцирует, использовалось детектирование по УФ-поглощению при 230 нм. Разделение соединений было выполнено на колонке Agilent ZORBAX Eclipse PAH (4,6 x 50 мм, 1,8 мкм), кат. № 959941-918. Данные обрабатывались в программном обеспечении HPLC 2D ChemStation.

Экстракция и очистка были выполнены с использованием набора для экстрагирования с буферными солями Agilent Bond Elut Buffered QuEChERS AOAC, кат. № 5982-5755, и набора для дисперсионной ТФЭ Bond Elut QuEChERS AOAC, кат. № 5982-5158 (Agilent Technologies).

Параметры оборудования

Условия ВЭЖХ

Таблица 1. Условия ВЭЖХ при разделении ПАУ

Колонка	Agilent ZORBAX Eclipse PAH C18 4,6 x 50 мм, 1,8 мкм	
Скорость потока	0,8 мл/мин	
Температура колонки	18 °C	
Вводимый объем	5 мкл	
Подвижная фаза	A = Деионизированная вода	B = CH_3CN
Градиент	Время (мин)	% B
	0	60
	1,5	60
	7	90
13	100	

Детектирование: по УФ-поглощению при 230 нм для Асу и флуоресцентное при различных длинах волн возбуждения флуоресценции (Ex) и испускания (Em) для остальных соединений

Длины волн:

Время (мин)	Ex/Em длины волн (нм)	Обнаруживаемые ПАУ
0 – 5 (темно-синие хроматограммы)	260/352	Nar, Ace, Flu, Phe, Chr
0 – 14 (красные хроматограммы)	260/420	Ant, Pyr, BeP, DahA, BghiP
0 – 14 (голубые хроматограммы)	260/460	Flu, 1,2-BaA, BeA, BkF, InP

Пробоподготовка

Проба почвы была отобрана в местном ботаническом саду в Грэмстауне (ЮАР), высушена на воздухе при температуре окружающей среды, а затем просеяна для достижения однородности.

Экстракция

5 г гомогената почвы помещались в центрифужную пробирку на 50 мл из набора для экстрагирования Bond Elut QuEChERS AOAC. К пробам добавляли соответствующие растворы ПАУ с целью получения оптимальных рабочих растворов для исследования точности воспроизведения содержания анализируемых веществ и воспроизводимости результатов. 2000 мкл раствора ПАУ добавляли ко всем пробам, кроме холостой. После этого в пробирку добавляли 5,0 мл воды и ее интенсивно встряхивали в течение 1 мин. Затем добавляли 10 мл CH_3CN с последующим добавлением пакетированной соли для экстракции Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC (кат. № 5082-5755), содержащей 6 г безводного MgSO_4 и 1,5 г безводного ацетата натрия. Пробирки с пробами интенсивно встряхивали вручную в течение 1 мин, а затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин.

Очистка с помощью дисперсионной ТФЭ

Аликвоту объемом 6,0 мл верхнего ацетонитрильного слоя переносили в пробирку для дисперсионной ТФЭ Bond Elut QuEChERS AOAC на 15 мл. В пробирке для ТФЭ содержалось 400 мг сорбента на основе первичного-вторичного амина (ПВА), 400 мг сорбента C18EC и 1200 мг безводного сульфата магния MgSO_4 . После встряхивания в течение одной минуты пробирку центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин. Затем аликвоту экстракта объемом 4 мл фильтровали через поливинилиденфторидный шприцевой фильтр 0,45 мкм, после чего 1000 мкл экстракта помещали во флакон для автосамплера для анализа методом ВЭЖХ с ФЛД.

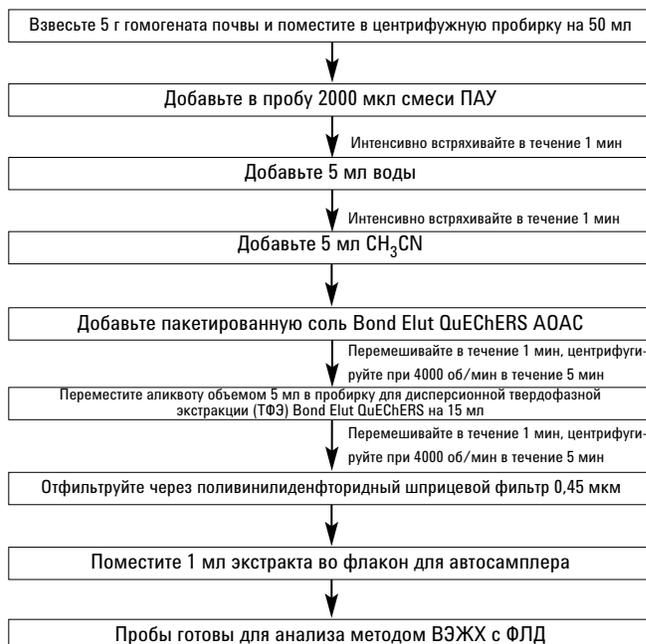


Рис. 2. Блок-схема процедуры пробоподготовки с использованием метода AOAC QuEChERS

Результаты и обсуждение

Хроматографический анализ

Разделение 16 ПАУ было выполнено на колонке Agilent ZORBAX Eclipse PAH (4,6 x 50 мм, 1,8 мкм) путем градиентного элюирования бинарной смесью ацетонитрил — вода. Хроматограмма стандартной смеси представлена на рис. 3. Хроматограмма холостого экстракта почвы представлена на рис. 4, а наложенные хроматограммы пробы почвы с первым уровнем добавок смеси ПАУ (см. табл. 3) представлены на рис. 5.

Для обнаружения и количественного анализа для флуоресцентного детектора задавались различные длины волн испускания (табл. 1), чтобы учесть различия в интенсивности поглощения для разных ПАУ. Наложенные хроматограммы на рис. 3 и 5 даны различными цветами в соответствии с выбранными длинами волн возбуждения и испускания. В ходе анализа были использованы следующие длины волн

возбуждения/испускания: темно-синяя хроматограмма: 260/352 нм; красная хроматограмма: 260/420 нм; голубая хроматограмма: 260/440 нм. В связи с отсутствием флуорофора в аценафтилене, для него использовали детектирование по УФ-поглощению при 230 нм.

Экстракция QuEChERS

Использование CH_3CN в качестве растворителя для экстракции в условиях высаливания без необходимости добавления сопутствующих растворителей помогло получить высокие выходы экстракции, что отражено точностью воспроизведения содержаний ПАУ в табл. 4. Кроме того, растворитель CH_3CN совместим с процедурой ВЭЖХ с ФЛД, описанной в настоящей методической информации. Таким образом, выпаривания или повторного задействования растворителя не требуется. Это особенно важно для ПАУ, так как некоторые из этих соединений (нафталин, аценафтен и флуорен) очень летучи и могут быть утеряны на этапе выпаривания [7].

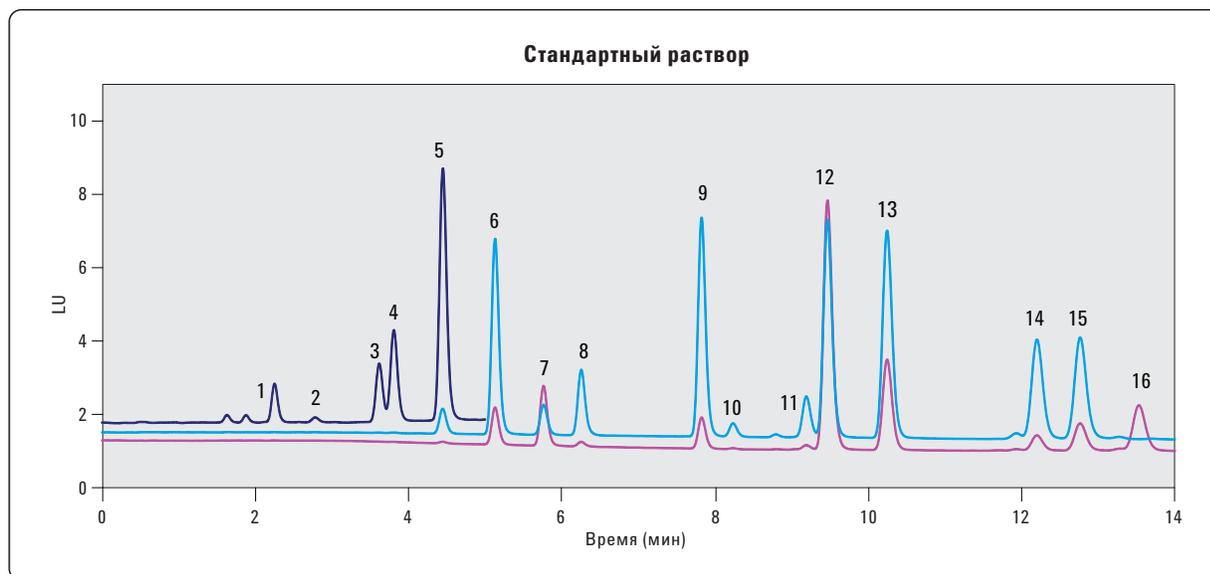


Рис. 3. Наложенные хроматограммы ВЭЖХ с ФЛД стандартной смеси, содержащей: 1. нафталин 2. аценафтилен 3. аценафтен 4. флуорен 5. фенантрен 6. антрацен 7. флуорантен 8. пирен 9. 1,2-бензо(а)антрацен 10. хризен 11. бензо(е)пирен 12. бензо(е)аценафтилен 13. бензо(к)флуорантен 14. дибензо(а, h)антрацен 15. бензо(г, h, i)перилен 16. индено[1,2,3-сd]пирен. Концентрация ПАУ составила 1 мг/мл. В ходе анализа были использованы следующие длины волн возбуждения/испускания: синяя хроматограмма: 260/352 нм; красная хроматограмма: 260/420 нм; голубая хроматограмма: 260/440 нм. В связи с отсутствием флуорофора в аценафтилене, для него использовали детектирование по УФ-поглощению при 230 нм. Условия хроматографического анализа указаны в табл. 1.



Рис. 4. Хроматограмма холостого экстракта пробы почвы. Условия хроматографического анализа указаны в табл. 1. Для построения базовой линии хроматограммы были использованы следующие длины волн возбуждения/испускания: 260/352 нм. При других условиях по возбуждению/испусканию никаких дополнительных интерференций обнаружено не было.

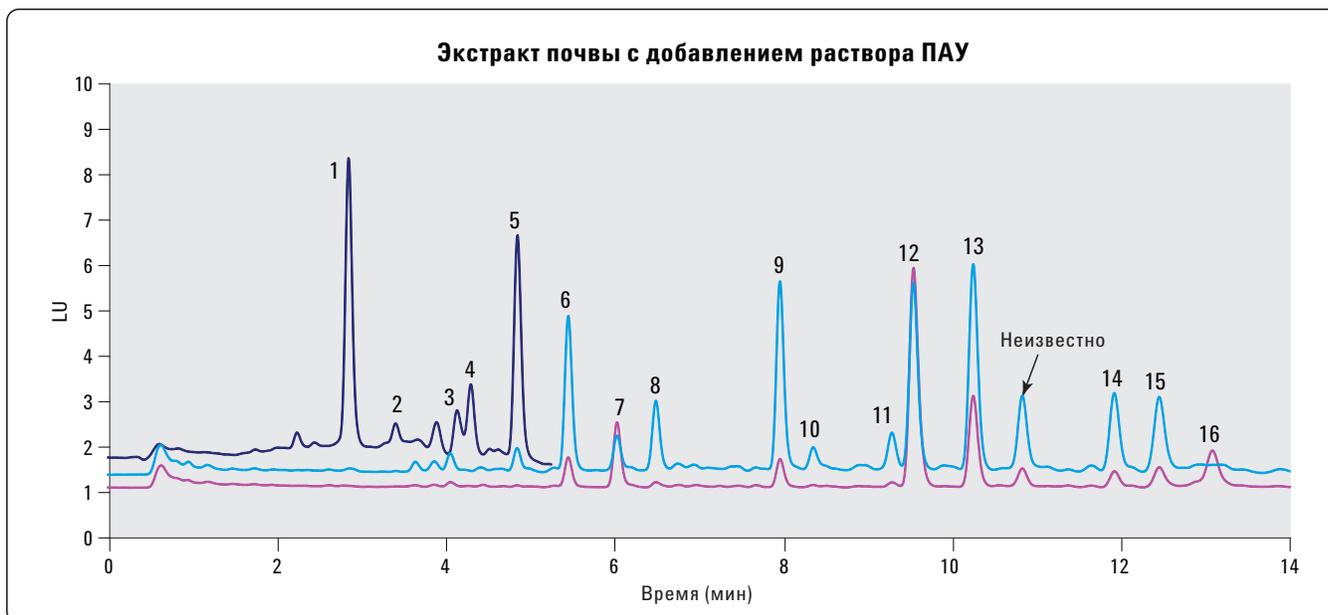


Рис. 5. Наложенные хроматограммы ВЭЖХ с ФЛД пробы почвы с добавлением смесей ПАУ, содержащих: 1. нафталин 2. аценафтилен 3. аценафтен 4. флуорен 5. фенантрен 6. антрацен 7. флуорантен 8. пирен 9. 1,2-бензо(а)антрацен 10. хризен 11. бензо(е)пирен 12. бензо(е)аценафтилен 13. бензо(к)флуорантен 14. дибензо(а,н)антрацен 15. бензо(г,н,и)перилен 16. индено[1,2,3-сд]пирен. Для этой пробы был использован первый уровень добавок смеси ПАУ (см. табл. 3). В ходе анализа были использованы следующие длины волн возбуждения/испускания: синяя хроматограмма: 260/352 нм; красная хроматограмма: 260/420 нм; голубая хроматограмма: 260/440 нм. В связи с отсутствием флуорофора в аценафтилене, для него использовали детектирование по УФ-поглощению при 230 нм. Условия хроматографического анализа указаны в табл. 1.

Линейность, предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ)

Линейность

Линейные калибровочные кривые были получены путем построения графика зависимости площади пика для каждого определяемого вещества от его концентрации. Кривые были созданы путем добавления ПАУ к холостым растворам проб в диапазоне концентраций от 0 до 300 нг/г.

Пределы обнаружения и количественного определения

Пределы обнаружения и количественного определения определяли исходя из концентрации сульфонамидов, обеспечивающей соотношение «сигнал — шум» 3 и 10 соответственно. В табл. 2 приведены регрессионные уравнения, коэффициенты корреляции и сами пределы обнаружения и количественного определения.

Таблица 2. Линейность, предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ) для шестнадцати полициклических ароматических углеводородов

ПАУ	Регрессионное уравнение	R ²	LOD	LOQ
Нафталин	$Y = 0,0266x + 0,1568$	0,9992	0,48	1,6
*Аценафтилен	$Y = 0,0580x - 0,1323$	0,9991	0,06	0,20
Аценафтен	$Y = 0,0176x + 0,0122$	0,9995	0,12	0,41
Флуорен	$Y = 0,0358x - 0,1701$	0,9991	0,24	0,79
Фенантрен	$Y = 0,1097x - 0,4277$	0,9994	0,07	0,22
Антрацен	$Y = 0,0884x - 0,096$	0,9993	0,18	0,60
Флуорантен	$Y = 0,0273x - 0,0069$	0,9997	0,07	0,24
Пирен	$Y = 0,0284x - 0,1041$	0,9993	0,005	0,02
1,2-бензантрацен	$Y = 0,0120x - 0,0249$	0,9994	0,78	0,26
Хризен	$Y = 0,0067x + 0,0165$	0,9992	0,007	0,02
Бензо[е]пирен	$Y = 0,017x - 0,0252$	0,9995	0,008	0,03
Бенз[е]аценафтилен	$Y = 0,1304x + 0,0727$	0,9993	0,03	0,11
Бензо[к]флуорантен	$Y = 0,052x + 0,0165$	0,9993	0,06	0,21
Дибензо[а,н]антрацен	$Y = 0,062x - 0,0346$	0,9994	0,18	0,6
Бензо[г,н,и]перилен	$Y = 0,0599x + 0,0779$	0,9995	0,18	0,81
Индено[1,2,3-с,д]пирен	$Y = 0,0352x - 0,1588$	0,9992	0,05	0,59

* Детектирование по УФ-поглощению при 230 нм

Точность воспроизведения содержаний и воспроизводимость результатов

Точность воспроизведения содержаний и воспроизводимость результатов (относительное стандартное отклонение, RSD) оценивали для трех различных уровней добавок ПАУ (табл. 3). Для каждого уровня осуществляли шесть параллельных анализов ($n = 6$). В табл. 4 приведена точность воспроизведения содержаний и значения относительного стандартного отклонения для шестнадцати полициклических ароматических углеводородов.

Выводы

Для одновременного обнаружения шестнадцати полициклических ароматических углеводородов в почве на уровне миллиардных долей была разработана простая и быстрая методика определения остаточных количеств многих соединений, основанная на методе Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC и методе ВЭЖХ с ФЛД. Была достигнута высокая точность воспроизведения содержаний при превосходных значениях относительного стандартного отклонения результатов анализа, что позволило сделать вывод о применимости данного метода для количественного контроля содержания ПАУ в реальных пробах.

Таблица 4. Точность воспроизведения содержания и относительные стандартные отклонения (RSD) для шестнадцати полициклических ароматических углеводородов в пробе почвы ($n = 6$)

ПАУ	Уровень добавок (нг/г) ($n = 6$)					
	1		2		3	
	Найденное содержание в % от истинного	%RSD	Найденное содержание в % от истинного	%RSD	Найденное содержание в % от истинного	%RSD
Нафталин	96,5	0,7	86,2	1,4	92,8	1,4
*Аценафтилен	87,3	0,7	90,0	1,3	91,7	1,6
Аценафтен	91,0	1,8	89,2	1,1	89,7	1,4
Флуорен	95,2	0,8	91,4	1,3	86,0	1,2
Фенантрен	93,0	1,0	94,6	0,7	98,1	0,9
Антрацен	91,9	1,1	90,0	0,8	97,6	0,7
Флуорантен	93,5	1,7	94,7	1,3	87,9	1,5
Пирен	96,3	1,3	89,4	0,9	91,2	1,9
1,2-бензантрацен	92,9	1,7	87,8	1,5	92,8	0,7
Хризен	98,0	1,4	92,4	1,2	95,8	1,0
Бензо[е]пирен	97,2	1,0	97,5	0,7	90,3	0,8
Бензо[а]аценафтилен	93,2	0,9	93,1	0,6	98,0	0,7
Бензо[к]флуорантен	94,1	1,1	97,6	0,7	91,4	1,1
Дибензо[а,h]антрацен	89,2	1,0	99,2	1,7	90,8	1,3
Бензо[g,h,i]перилен	91,0	0,9	96,7	0,8	97,3	1,6
Индено[1,2,3-с,d]пирен	86,0	1,2	97,8	0,8	94,3	1,3

* Детектирование по УФ-поглощению при 230 нм

Таблица 3. Уровни добавок смеси ПАУ

ПАУ	Уровень добавок (нг/г)		
	1	2	3
Нафталин	20	100	200
*Аценафтилен	20	100	200
Аценафтен	10	50	100
Флуорен	10	50	100
Фенантрен	10	50	100
Антрацен	10	50	100
Флуорантен	10	50	100
Пирен	10	50	100
1,2-бензантрацен	5	20	50
Хризен	10	50	100
Бензо[е]пирен	5	20	50
Бензо[е]аценафтилен	5	20	50
Бензо[к]флуорантен	5	20	50
Дибензо[а,h]антрацен	5	20	50
Бензо[g,h,i]перилен	5	20	50
Индено(1,2,3-сd)пирен	5	20	50

* Детектирование по УФ-поглощению при 230 нм

Литература

1. Method 4035, Soil Screening for Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Immunoassay, Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, vols. I and II, 3rd ed., EPA/SW-846, US Environmental Protection Agency Washington, DC, 1995, pp. 1 – 10.
2. F. Busetti, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer, P. Traverso, "Determination of Sixteen Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous and Solid Samples from an Italian Wastewater Treatment Plant," *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 104 – 115.
3. Z. Khan, J. Troquet, C. Vachelard, "Sample Preparation and Analytical Techniques for the Determination of Polyaromatic Hydrocarbons in Soil," *J. Environ. Sci. Tech.* 2 (2005) 275 – 286.
4. P. R. Kootstra, M. H. C. Straub, G. H. Stil, E. G. van der Velde, W. Hesselink, C. C. J. Land, "Solid-Phase Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil Samples," *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 123 – 129.
5. M. Anastassiades, S. Lehotay, "Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and 'Dispersive Solid-Phase Extraction' for the Determination of Pesticide Residues in Produce," 2003, 86, 412 – 431.
6. J. W. Henderson, Jr., W. Biazzo, W. Long, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) Separation Using ZORBAX Eclipse PAH Columns – Analyses from Six to 24 PAHs," Agilent Technologies publication, 5989-7968EN.
7. M. J. Ramalhosa, P. Paiga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M. B. P. P. Oliveira, "Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fish: Evaluation of a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Extraction Method," *J. Sep. Sci.* 2009 32 3529 – 3538.

Дополнительная информация

Дополнительную информацию о продуктах и услугах нашей компании см. на веб-сайте www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2012
Напечатано в США
6 января 2012 г.
5990-5452RU



Agilent Technologies