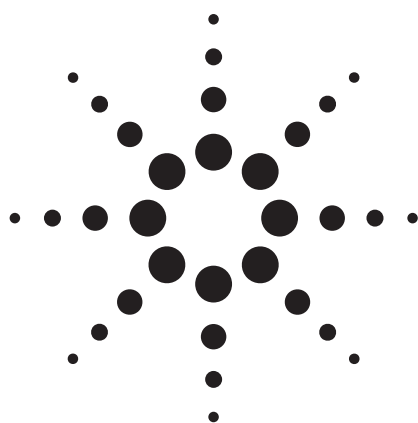


用 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱分离多环芳烃 (PAH) — 从 6 种到 24 种 PAH 进行分析



应用

食品安全和环境

作者

John W. Henderson, Jr., William Biazzo, William Long
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

使用 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱和乙腈/水流动相通过反相液相色谱 (HPLC) 分离各种多环芳烃 (PAH) 混合物。这些分析包括从 6 种到 24 种不等的 PAH 混合物的分离。为了分离一系列的 PAH，需要调节梯度以及温度来优化分离度。对于这些多环芳烃的分离，各种规格的多环芳烃色谱柱能够为食品和环境化学家提供最佳的色谱柱选择，从而改进和优化了分离度、分析时间、检测器选择、样品量或系统压力。

引言

多环芳烃 (PAH) 是由于碳氢化合物（例如煤炭、煤气、燃油和木材）的不完全燃烧而形成的。它们多产生于汽车尾气、森林火灾，甚至是烤肉时（烤焦且冒烟）。通常，它们以混合物的形式存在，并以微粒和烟尘的形式在空气中散播。

鉴于 PAH 来源范围很广，而且具有极强的致癌性，很多政府部门，例如美国职业安全与卫生管理局 (OSHA)、美国国家职业安全健康研究所 (NIOSH) 和欧盟的食品科学委员会，已针对含量上限进行了提议并作出了要求；因此，包括 HPLC 方法在内的分析方法都在进行改进以监测 PAH。

PAH 样品基质种类多样（空气、水、土壤和食物）且 PAH 有 100 多种化合物，需要不同的分析技术对他们进行分析。然而，由于 Eclipse PAH 色谱柱有多种规格，并具有优异的可扩展性和重现性，而且柱寿命长，因此它们可用来开发多种 PAH 的 HPLC 分析方法。对于 PAH 分析，因为相对于其它技术（例如配有火焰离子化检测器的气相色谱系统），紫外和荧光检测通过紫外和荧光光谱增强了其选择性，所以 HPLC 方法非常有用。

有关 PAH 分析最权威的示例就是使用 EPA 610 方法对 16 种化合物进行分离。但对于食品和环境分析，这 16 种化合物中的 PAH 和其它 PAH 可能都需要进行分离。这里给出了五种不同 PAH 混合物的例子，包括对只有 6 种 PAH 的食品筛选方法和对含有多达 18 种 PAH 化合物的食品进行更全的分析方法。另外，还显示三种不同环境样品的分离，样品中的 PAH 从 16 种到 24 种不等。



Agilent Technologies

所有这些示例都使用 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱，通过改变流动相梯度和色谱柱规格对分离度和分析时间进行优化。所有这些分析都用乙腈/水做流动相，因为对于许多标准化的 PAH 方法（如 EPA 610 和 EPA 8330），这是一种常用的流动相。改变柱温可改变选择性，这对优化 PAH 方法，尤其对分析食品中潜在 PAH 的较复杂的方法很有用。使用了几种规格的色谱柱来说明自创建方法的过程，重点强调了速度、分离度，或针对具有不同压力限制的 HPLC 仪器而进行的色谱柱选择。影响选择色谱柱规格的其它因素还有样品基质和样品浓度。

实验

在 ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱和 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统上建立 PAH 分离方法，该系统包括：

- G1379 脱气机
- G1312B SL 型二元泵
 - 流动相通道 A：水，B：乙腈。有关梯度条件，请见图
 - 当使用 2.1 mm 内径的色谱柱时，低延迟体积模式设置二元泵，且将静态混合器和脉冲阻尼器旁路。有关用低延迟体积和标准延迟体积设置二元泵的详细信息，请参阅参考文献 1
- G1367C HiP-ALS SL 型自动进样器
- G1316B TCC SL 型柱温箱
 - 温度：25 °C
 - 当使用 2.1 mm 内径色谱柱时，用低体积 (1.6 µL) 热交换器 (G1316-8002) 替代内置的 3 µL 热交换器
- G1315C SL 型二极管阵列检测器
 - 设置为“220 nm，4 nm，不用参比波长”，配置 G1315 - 60025 流通池（容积为 5 µL），响应时间设置为 0.5 s
- G1321A FLD 荧光检测器
- 有关所使用的色谱柱和其它具体的方法参数，请参见图

PAH 混合物为购买的现成溶液，或由各种标样混合配制而成。用甲苯或二氯甲烷溶解纯化化合物。用乙醇稀释。各种 PAH 从几个商业渠道获得：

- 图 1：PAH 混合物（安捷伦部件号 8500-6035）
- 图 2：PAH 混合物（安捷伦部件号 8500-6035）包括三联苯-d14（Ultra Scientific 部件号 ATS-160-1）、1-甲基萘（Ultra Scientific 部件号 EPA-1225）、2-甲基萘（Ultra Scientific 部件号 SV-200-1）和苯并[e]芘（Accu-Standard H-112S）
- 图 3 和图 4：加拿大魁北克省环境部 PAH 混合物（AccuStandard 部件号 H-QME-01）
- 图 5 到图 7：由溶液或来自 AccuStandard 的纯 PAH 化合物制成：

苯并[c]菲	H-244N
苯并菲	H-235N
苯并[a]蒽	Z-013-04
蒽	H-115N
苯并[b]荧蒽	H-128N
苯并[k]荧蒽	H-129N
苯并[a]芘	H-169N
苯并[g,h,i]芘	H-103N
茚并[1,2,3-c,d]芘	H-157N
二苯并[a,i]芘	H-178N
二苯并[a,h]芘	H-177N

来自 Cerilliant：

环戊[c,d]芘	SCC-048
5-甲基蒽	ERM-028
苯并[j]荧蒽	ERB-005
二苯并[a,l]芘	ERD-051
二苯并[a,h]蒽	ERD-052
二苯并[a,e]芘	ERD-009

来自 Sigma-Aldrich：

苯并[c]芘	T175560
--------	---------

结果与讨论

此前在对实际 PAH 样品分离中，ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱曾表现出良好的耐用性。用 EPA 优先污染物 PAH 标准混合物 (EPA 610) 方法证实了柱寿命、

批与批的重现性以及三个粒径色谱柱间一致的选择性 [2]。图 1 显示了使用荧光检测器 (FLD) 对三种不同上样量的 PAH 的分离情况。使用 FLD 检测器时, 该方法的灵敏度 (信噪比 > 10:1) 在皮克范围内 (图 1)。紫外检测的检测限大约比荧光检测低 100 倍 [3]。16 种 PAH 中只有 15 种被检测到, 因为芘 (峰 2) 不发射荧光。在色谱图中显示了为获得最佳结果而对 FLD 进行的具体设定, 并包括光电倍增管 (PMT) 的设置。色谱图上列出柱上 10 ng 样品时的色谱条件, 柱上 500 pg 和 50 pg 样品时, 色谱条件做了相应的调整, 也在色谱图中表示出来。

将另外四种 PAH 与 EPA 610 混合物混合, 制成 20 种化合物的标样, 用于特定的应用。其中两种 PAH (1-甲基萘和 2-甲基萘) 在加到 EPA 610 混合物中后, 即形成 “Florida Administrative Code”, (17.700 小节, 有关治理土壤) 中说明的 PAH 混合物。另两种加入的 PAH 是三联苯和苯并[e]芘。图 2 显示了在 Eclipse PAH 色谱柱上分离所有这 20 种分析物的色

谱图。相对于通常用于 16 种 PAH 分析的梯度, 该梯度已作出了调整, 以便完全分离加入的分析物。

加拿大魁北克省环境部 PAH 标样是一种更复杂的 PAH 混合物, 它包括 24 种 PAH。图 3 显示了它的分离结果。使用了快速分离 Eclipse PAH 4.6 mm x 150 mm, 3.5 μ m 色谱柱进行分析。与 1.8 μ m 色谱柱相比, 这种快速分离 (RR, 3.5 μ m) 的优点是压力更低, 使这种长的快速分离色谱柱可以在 Agilent 1100 和 Agilent 1200 (非高分离度快速液相色谱) 上运行, 因为操作压力低于 400 bar。

如果使用更短的快速分离高通量 (RRHT, 1.8 μ m) 4.6 mm x 100 mm 色谱柱 (图 4), 则关键组 (峰 13、14 和 15) 化合物的分离能够获得相似的分度, 并能显著地缩短时间。色谱柱的内径保持不变, 因此梯度方法所需的时间随着色谱柱长度变短而成比例缩短。由于压力高于 400 bar, 所以需要采用 Agilent 1200 高分离度快速液相色谱系统。

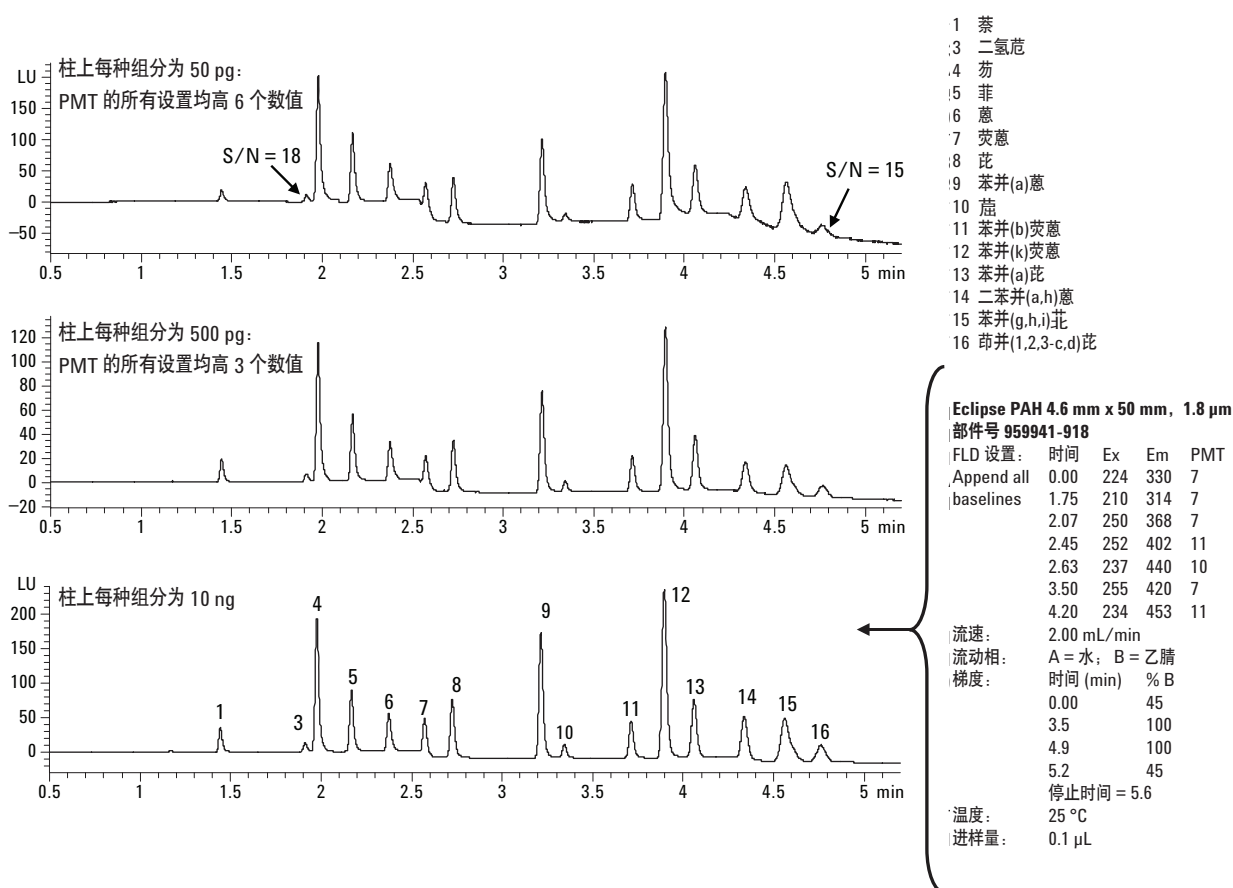


图 1. FLD 检测的定量灵敏度: 信噪比 ≥ 10 , EPA 610 方法 PAH, 在 Eclipse PAH 4.6 mm x 50 mm, 1.8 μ m 色谱柱的分离

图 5 显示了对 18 种 PAH 进行的又一个复杂分析。这是欧盟“15+1”PAH（欧盟食品科学委员会 (SCF) 建议监测的 15 种 PAH，加上由 FAO/WHO 食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 在 2005 年增加的苯并[c]芘 [4]）和另外两种 PAH（苯并[a]芘和苯并[e]芘）的组合。用简单的梯度，在 Eclipse PAH 色谱柱 (2.1 mm x 50 mm, 1.8 μ m) 上所有 18 种 PAH 可以在 9 分钟内完成分离。此处选择的色谱柱还是 RRHT1.8 μ m 色谱柱，因为柱子短和所使用的流动相，所以压力不超过 400 bar。

温度是改变选择性的有效手段。请注意，图 5 中在 25 $^{\circ}$ C 时关键两峰（峰 2 和 3）的分离度是 1.44。人们已注意到，用 PAH 色谱柱的聚合键合相，降低温度可以提高分离度；此处就使用了这种方法提高了峰 2 和 3 的分离度。图 6 显示了三种温度（25、20 和 15 $^{\circ}$ C）下的分离结果。关键两峰的分离度从 1.44 分别提高到 2.01 和 2.52。但是，由于温度降低，峰 13

和 14 两峰离得很近。为使这两对峰都获得满意分离度，选择在 20 $^{\circ}$ C 下进行操作。显而易见，几度的温度变化就会使色谱产生差异，因此应严格地控制温度，尤其是在室温下操作时，因为实验室内的温度可能会有波动。对于 Eclipse PAH 色谱柱，最高操作温度为 60 $^{\circ}$ C（pH 值低于 6），但大部分 PAH 分离在该色谱柱上会在 15 到 35 $^{\circ}$ C 之间获得最佳结果。

最后一个示例与关于饮用水质量的欧洲共同体 80/778/EEC 指令有关，要求通过等度分析快速筛选水样中的 PAH。使用短色谱柱和等度流动相来消除梯度所需的再平衡时间，从而实现高通量分析。快速分离色谱柱 (3.5 μ m) 分离样品的时间大约为 4 分钟，快速分离高通量色谱柱 (1.8 μ m) 则将分析时间缩短到 2 分钟，而不损失分离度（图 7）。由于色谱柱短而且乙腈浓度高，因此对于该色谱柱，较高压力及高流速不会对其有较大影响。

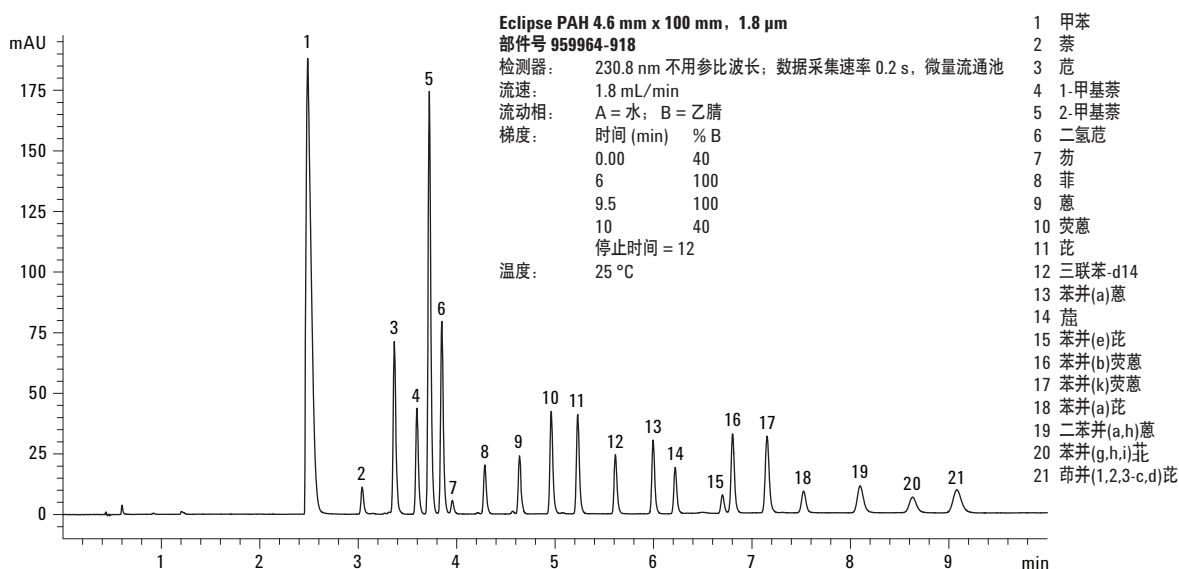


图 2. 快速分离高通量分析 - Florida Administrative Code 17.000，包括两种额外添加的 PAH

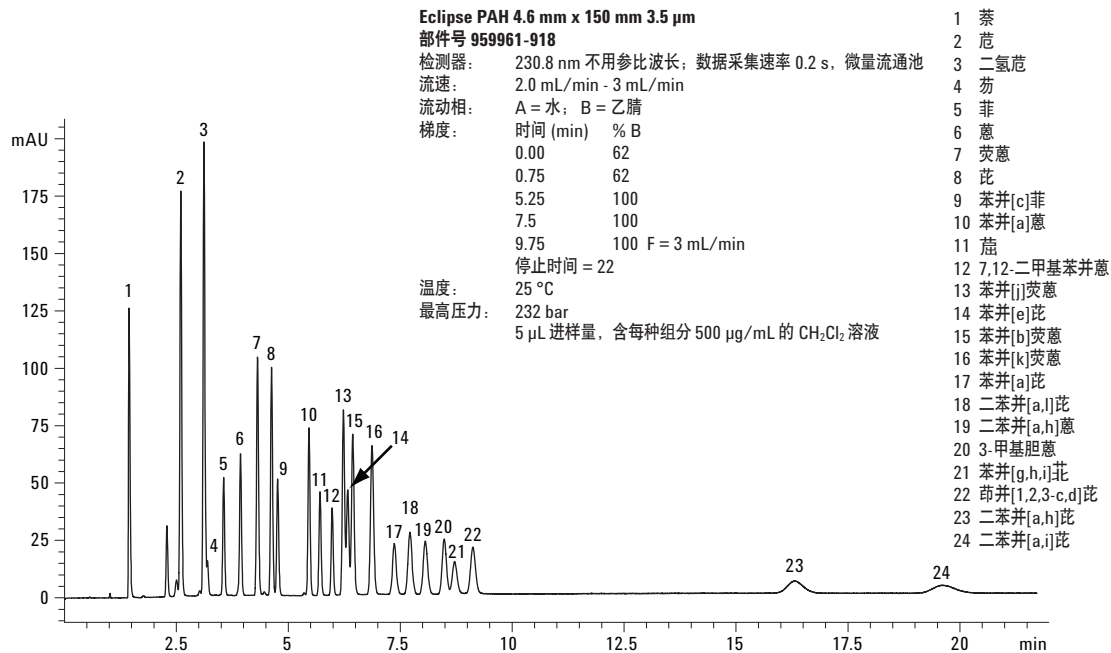


图 3. 加拿大魁北克省环境部 PAH 标样快速分离分析选项

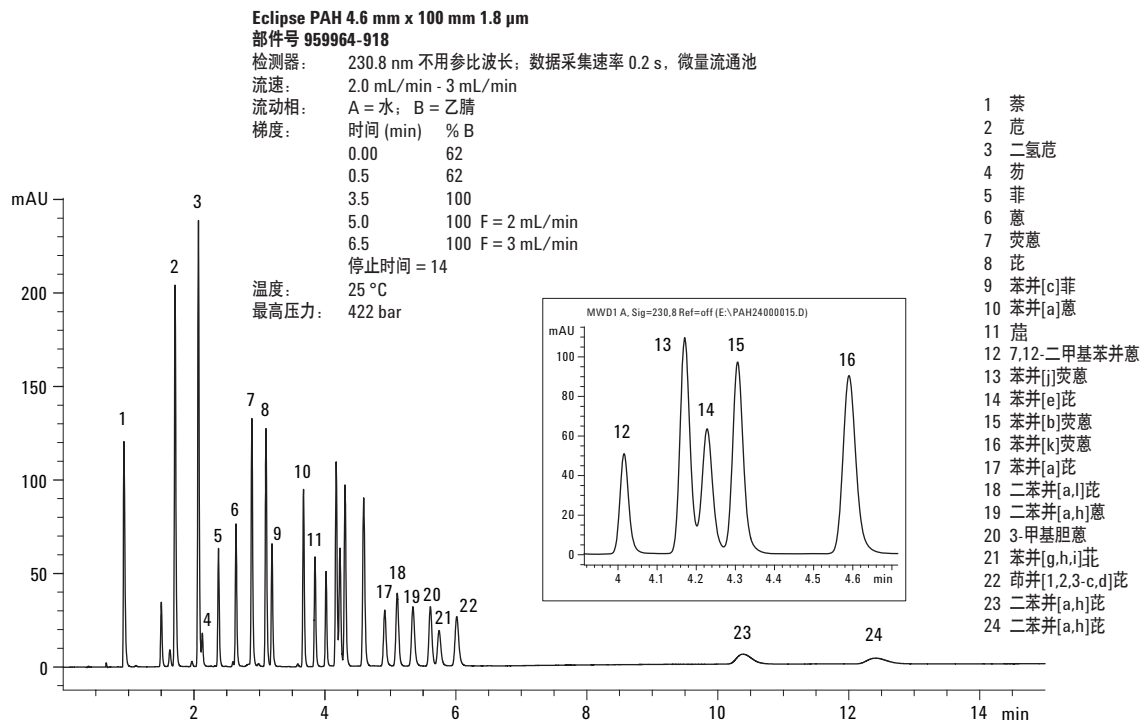


图 4. 加拿大魁北克省环境部 PAH 标准样快速分离高通量分析选项

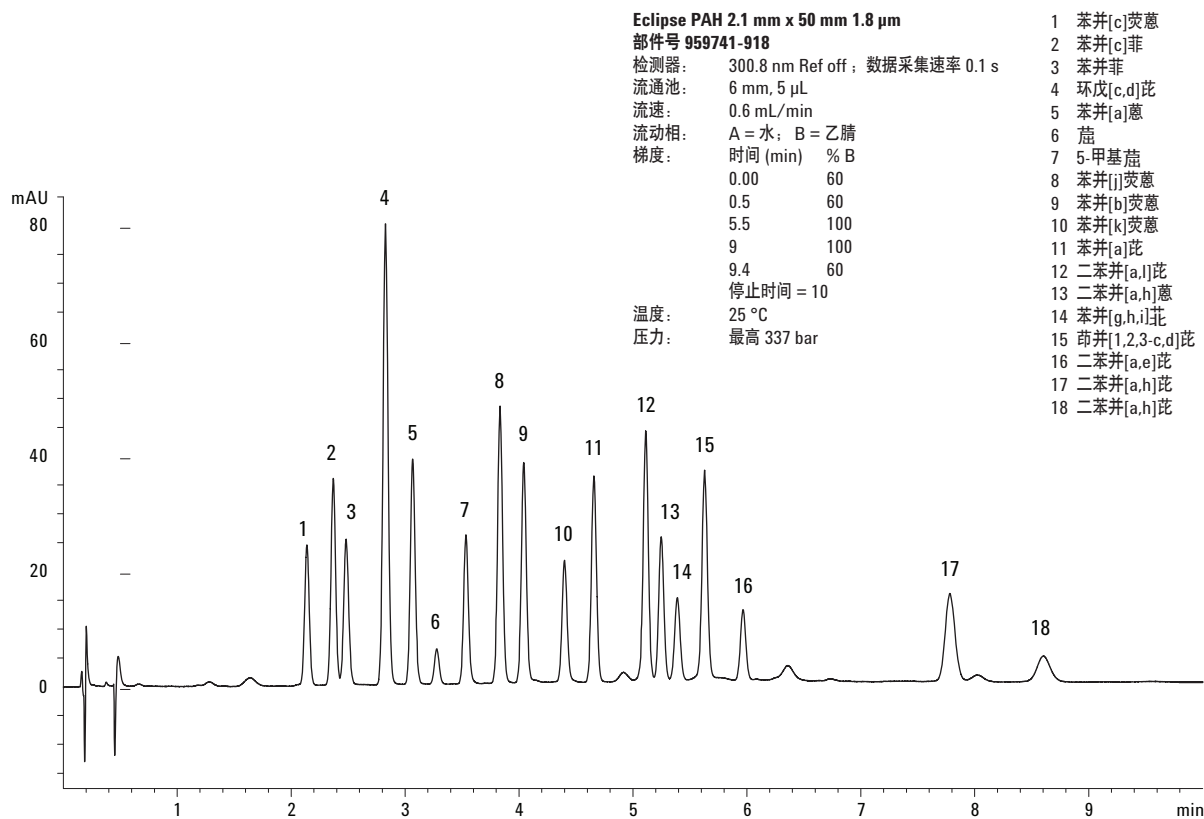


图 5. 欧盟的 SCF 和 JECFA “15+1” 及另外两种 PAH

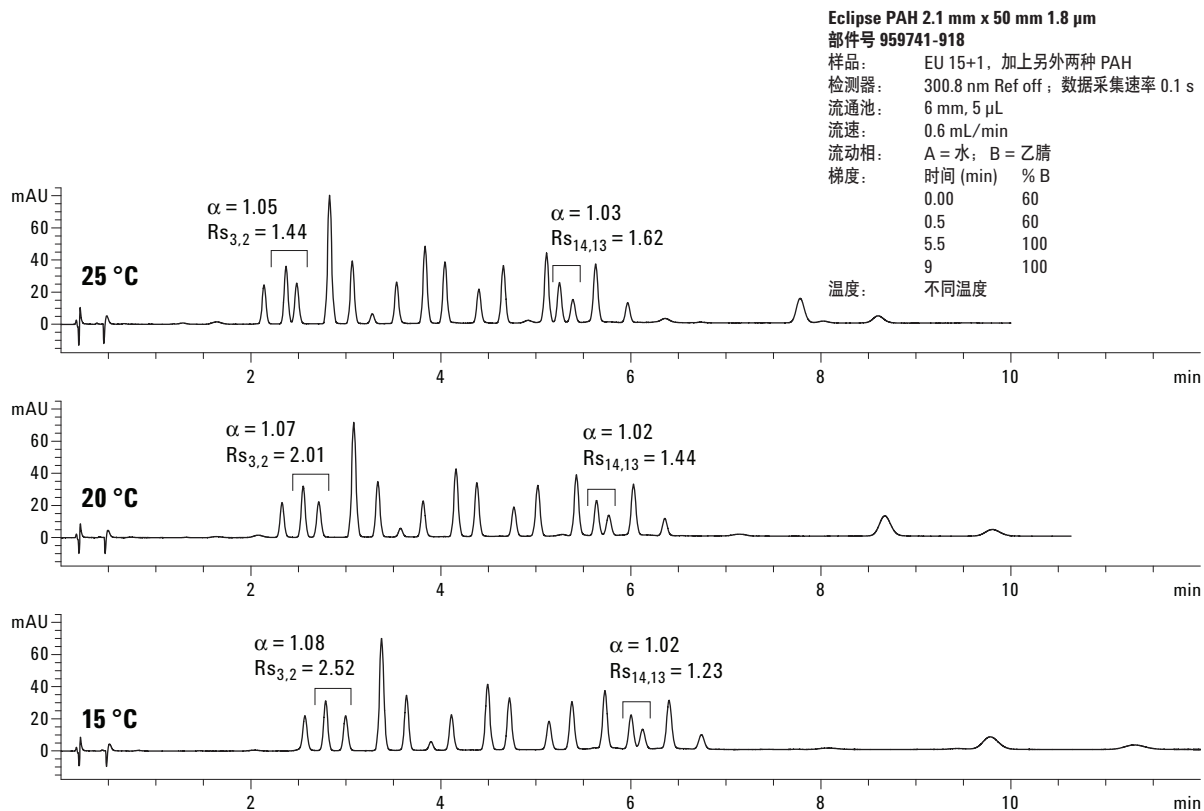
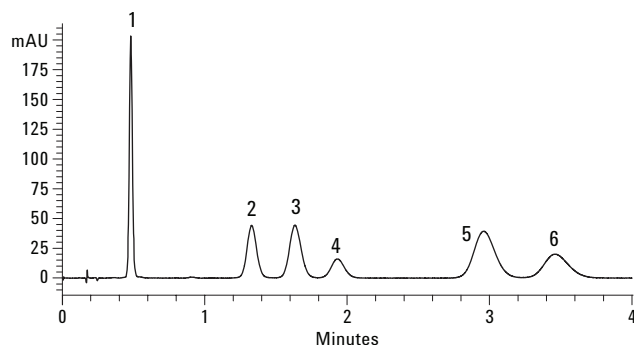
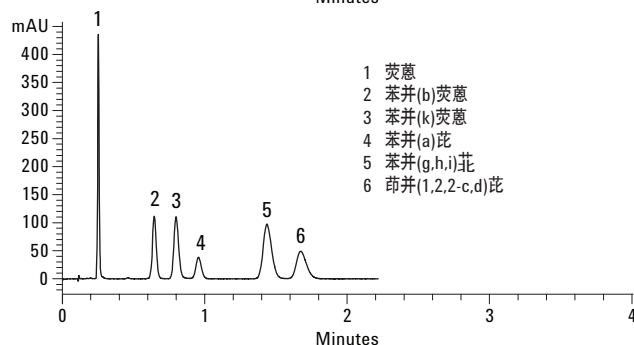


图 6. 温度对 PAH 峰间距的影响



Eclipse PAH, 4.6 mm x 50 mm, 3.5 μ m
 部件号 959943-918
 检测器: 220.4 nm
 流速: 2.5 mL/min
 流动相: A = 水; B = 乙腈
 流动相比例: 92% B
 温度: 20 $^{\circ}$ C, 低体积散热片
 压力: 105 bar



Eclipse PAH, 4.6 mm x 30 mm, 1.8 μ m
 部件号 959931-918
 检测器: 220.4 nm
 流速: 2.5 mL/min
 流动相: A = 水; B = 乙腈
 流动相比例: 95% B
 温度: 20 $^{\circ}$ C, 低体积散热片
 压力: 147 bar

图 7. 快速分离 PAH 色谱柱筛选欧洲共同体 80/778/EEC 指令中规定的 PAH

结论

ZORBAX Eclipse PAH 色谱柱被证明具有良好的耐用性使其成为空气、水、土壤和食品等基质中各种 PAH 样品的理想选择。

在五个示例中，来自环境和食品安全行业的 PAH 混合物（包含的 PAH 从 6 种到 24 种不等）在不同规格的 Eclipse PAH 色谱柱上成功进行了分离。梯度组成、温度、色谱柱规格等参数易于控制，便于方法开发和优化。Eclipse PAH 色谱柱广泛的配置对自定义分析速度和分离度，或者补充样品基质、样品浓度或检测器的选择都非常有用。

• 可用于方法优化的各种 Eclipse PAH 色谱柱:

- 959764-918 Eclipse PAH,
2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m
- 959793-918 Eclipse PAH,
2.1 mm x 100 mm, 3.5 μ m
- 959763-918 Eclipse PAH,
2.1 mm x 150 mm, 3.5 μ m
- 959701-918 Eclipse PAH,
2.1 mm x 150 mm, 5 μ m
- 959790-918 Eclipse PAH,
2.1 mm x 250 mm, 5 μ m
- 959741-918 Eclipse PAH,
2.1 mm x 50 mm, 1.8 μ m
- 959990-318 Eclipse PAH,
3.0 mm x 250 mm, 5 μ m
- 959964-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 100 mm, 1.8 μ m
- 959961-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 100 mm, 3.5 μ m
- 959996-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 100 mm, 5 μ m
- 959963-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 150 mm, 3.5 μ m
- 959993-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 150 mm, 5 μ m
- 959990-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 250 mm, 5 μ m
- 959931-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 30 mm, 1.8 μ m
- 959941-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 50 mm, 1.8 μ m
- 959943-918 Eclipse PAH,
4.6 mm x 50 mm, 3.5 μ m

参考文献

1. "High-Throughput Gradient Optimization by Easily Minimizing Delay Volume," Agilent Technologies publication 5989-6665EN (2007)
2. "Robustness of Eclipse PAH Columns," Agilent Technologies publication 5989-7828EN (2008)
3. "Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Analysis in Water with ZORBAX Eclipse PAH HPLC Column," Agilent Technologies publication 5989-7953EN (2008)
4. "Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons in food and the environment needed for new food legislation in the European Union," *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 25, No. 7, 2006

更多信息

如需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 29 日
5989-7968CHCN



Agilent Technologies