

中华人民共和国国家标准

水质 六种特定多环芳烃的测定 高效液相色谱法

GB 13198—91

Water quality—Determination
of specified six polynuclear
aromatic hydrocarbons—High
performance liquid chromatography

1 适用范围

本标准规定了测定水中多环芳烃(PAH)的高效液相色谱(HPLC)法。本标准参照采用国际标准 ISO/DIS 7981/2 高效液相色谱法分析的六种特定多环芳烃。

本标准适用于饮用水、地下水、湖库水、河水及焦化厂和油毡厂的工业污水中荧蒹、苯并(b)荧蒹、苯并(k)荧蒹、苯并(a)芘、苯并(ghi)芘、茚并(1,2,3-cd)芘六种多环芳烃的测定。

本法用环己烷提取水中多环芳烃,提取液通过弗罗里硅土柱,PAH 吸附在柱上,用丙酮加二氯甲烷混合溶液脱附 PAH 后,用配备荧光和(或)紫外检测器的高效液相色谱仪测定。本方法对六种 PAH 通常可检测到 ng/L 水平。

水样中若存在可被共萃取的能产生荧光信号或熄灭荧光的物质对本法也有干扰。本法用弗罗里硅土柱层析净化分离,可降低荧光背景。

2 试剂和材料

2.1 高效液相色谱流动相为水和甲醇的混合溶液。

2.1.1 甲醇:分析纯,用全玻璃仪器重蒸馏,要求有足够低的空白。

2.1.2 水:电渗析水或蒸馏水,加高锰酸钾在碱性条件下重蒸。在测定的化合物检测限内未观察到干扰。

2.2 配制标准样品和水样预处理使用的试剂和材料。

2.2.1 二氯甲烷(CH_2Cl_2):用全玻璃蒸馏器重蒸馏,在测定化合物检测限内不出现色谱干扰为合格。

2.2.2 丙酮($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$):同 2.2.1。

2.2.3 环己烷:分析纯,同 2.2.1。

注:若环己烷的纯度不够,可采用附录中两种办法中的任一种进行净化。

2.2.4 无水硫酸钠(Na_2SO_4):分析纯,在 400 °C 加热 2 h。

2.2.5 硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):分析纯。

2.2.6 弗罗里硅土(Florisil):60~100 目,色层分析用。在 400 °C 加热 2 h。冷却后,用水(2.1.2)调至含水量为 11%(m/m)。

2.2.7 碱性氧化铝:层析用,50~200 μm ,活度为 Brockmann I 级。达到 I 级的制法如下:

将氧化铝加热至 550 ± 20 °C 至少 2 h,冷却至 200~250 °C,移入放有高氯酸镁的干燥器内,继续冷却,即得活度为 Brockmann I 级的氧化铝。在干燥器内可存放五天。

2.2.8 柱层析用硅胶:100 目,在 300 °C 活化 4 h。

国家环境保护局 1991-08-31 批准

1992-06-01 实施

2.2.9 浓硫酸(H_2SO_4),分析纯。

2.2.10 标准溶液:

注:有些多环芳烃是强烈致癌的,因此操作时必须极其小心。不允许人体与多环芳烃固体物质、溶剂萃取物、多环芳烃标准品接触。多环芳烃可随溶剂一起挥发而沾附于具塞瓶子的外部,因此处理含多环芳烃的容器及实验操作过程必须使用抗溶剂的手套。被多环芳烃污染的容器可用紫外灯在 360 nm 紫外线下检查,并置于重铬酸钾-浓硫酸洗液中浸泡 4 h。标准溶液应在有适当设备(如合适的毒气橱、防护衣服、防尘面罩等)的实验室中配制。用固体化合物配多环芳烃标准品,在没有合适的安全设备及尚未正确掌握使用技术之前,不能进行。

2.2.10.1 色谱标准物:固体多环芳烃标准物为荧蒽、苯并(k)荧蒽、苯并(b)荧蒽、苯并(a)芘、茚并(1,2,3-cd)芘及苯并(ghi)芘等六种,纯度在 96% 以上。采用固体标准物配制标准储备液,亦可采用经证实为合格的市售多环芳烃标准溶液配置标准储备液。

2.2.10.2 用固体多环芳烃配制标准储备液:分别称量各种多环芳烃(2.2.10.1) 20 ± 0.1 mg,分别溶解于 50~70 mL 环己烷(2.2.1)中,再以环己烷稀释至 100 ± 0.1 mL,配成浓度为 $200 \mu\text{g/mL}$ 单个化合物的标准储备液。若用市售溶液配制标准储备液,可在容量瓶中使用环己烷稀释,使标准储备液的浓度各为 $200 \mu\text{g/mL}$ 的单化合物溶液。储备液保存在 4°C 冰箱中。

2.2.10.3 混合 PAH 标准溶液的配制:在 10 mL 容量瓶中加入各种 PAH 储备液(2.2.10.2) 1 ± 0.01 mL,用甲醇稀释至标线,使标准溶液中含各种多环芳烃的浓度各为 $20 \mu\text{g/mL}$ 的混合 PAH 标准溶液。标准液保存在 4°C 冰箱中。

2.2.10.4 标准工作溶液:根据仪器灵敏度及线性范围的要求,取不同量的混合 PAH 标准溶液(2.2.10.3),用甲醇(2.1.1)稀释,配制成几种不同浓度的标准工作溶液。

3 仪器

3.1 高效液相色谱仪:带荧光和紫外检测器的高效液相色谱仪。

3.1.1 恒流梯度泵系统。

3.1.2 反相柱:填料为 Zorbax $5 \mu\text{ ODS}_2$,柱长 250 mm,内径 4.6 mm。

3.1.3 荧光检测器:荧光分光光度计检测器,激发波长 280 nm,发射光波长大于 389 nm 截止点;荧光光度计检测器应有激发用的色散光系统和可用滤光片或色散光学系统的荧光发射部分。

3.1.4 紫外-可见光检测器:可调波长紫外检测器或固定波长为 254 nm 的紫外检测器,可单独使用,也可以与荧光检测器联用。

3.1.5 记录仪:与检测器匹配。

3.1.6 微量注射器:规格为 5,10,50,100 及 500 μL 。

3.1.7 恒温水浴(或恒温柱箱)。

3.2 采样瓶:1 L 具磨口玻璃塞的棕色玻璃细口瓶。

3.3 振荡器:调速,配备自动间歇延时控制仪。

3.4 玻璃器皿:

3.4.1 分液漏斗:1 000 mL,玻璃活塞不涂润滑油。

3.4.2 碘量瓶 200 mL。

3.4.3 层析柱:

3.4.3.1 净化环己烷层析柱:长 500 mm,内径 25 mm,玻璃活塞不涂润滑油的玻璃柱。

3.4.3.2 样品预处理层析柱:长 250 mm,内径 10 mm,玻璃活塞不涂润滑油的玻璃柱。

3.4.4 K-D 浓缩瓶:25 mL,带刻度,容积必须进行标定,带磨口玻璃塞。

3.4.5 K-D 蒸发瓶:500 mL。

3.4.6 K-D Snyder 柱:三球,常量。

3.4.7 K-D Snyder 柱:二球,微量。

3.4.8 量筒:500 mL。

3.5 玻璃毛或玻璃纤维滤纸:在 400 °C 加热 1 h。冷却后,保存在具塞磨口的玻璃瓶中。

3.6 沸石:在 100 °C 加热 1 h。冷却后,保存在具塞磨口的玻璃瓶中。

4 样品

4.1 样品的性质

4.1.1 样品名称:水样。

4.1.2 样品状态:液体。

4.1.3 样品稳定性:水样中的 PAH 对光敏感。

4.2 水样采集和储存方法

4.2.1 水样采集:样品必须采集在玻璃容器中,采样前不能用样品预洗瓶子,以防止样品的沾染或吸附。防止采集表层水,保证所采样品具有代表性。在采样点采样及盖好瓶塞时,样品瓶要完全注满,不留空气。若水中有残余氯存在,要在每升水中加入 80 mg 硫代硫酸钠(2.2.5)除氯。

4.2.2 水样保存:水样应放在暗处,4 °C 冰箱中保存;采样后应尽快在 24 h 内进行萃取。萃取后的样品在 40 天内分析完毕。

4.3 水样预处理

4.3.1 水样的萃取:摇匀水样,用 500 mL 量筒(3.4.8)量取 500 mL 水样(萃取所用水样体积视具体情况而定,可增减),加入 50 mL 环己烷(2.2.3),手摇分液漏斗,放气几次后,安装分液漏斗于振荡器架上(3.3),振荡 5 min 进行萃取。取下分液漏斗,静置约 15~30 min(静置时间视两相分开情况而定),分出下层水相留待进行第二次萃取,上层环己烷相放入 200 mL 碘量瓶(3.4.2)中,再用 50 mL 环己烷对水样进行第二次萃取,水相弃去,环己烷萃取液并入同一碘量瓶中,加无水硫酸钠(2.2.4)至环己烷萃取液清沏,至少放置 30 min,脱水干燥。

4.3.2 萃取液的净化:

4.3.2.1 饮用水的环己烷萃取液,可以不经柱层析净化,浓缩后直接进行 HPLC 分析。

4.3.2.2 地表水及工业污水用柱层析净化。

4.3.2.2.1 层析柱的装填:在玻璃层析柱(3.4.3.2)的下端,放入少量玻璃毛或玻璃纤维滤纸(3.5)以支托填料,加入 3 mL 环己烷(2.2.1)润湿柱子。称 4~6 g 弗罗里硅土(2.2.6)于小烧杯(3.4.9),用环己烷制成匀浆,以湿式装柱法填入上述柱中。净化地表水的柱,填充 4g 弗罗里硅土,净化污水的柱,填充 6 g 弗罗里硅土。放出柱中过量的环己烷至填料的界面。

4.3.2.2.2 萃取液的净化:从层析柱(4.3.2.1)的上端加入已干燥的环己烷萃取液,全部溶液以 1~2 mL/min 流速通过层析柱,用环己烷洗碘量瓶中的无水硫酸钠三次,每次 5~10 mL,环己烷洗涤液亦加入层析柱,回收通过柱的环己烷。被吸附在柱上的 PAH 用丙酮(2.2.2)和二氯甲烷(2.2.1)的混合溶液解脱。地表水用 100 mL (88 mL 丙酮+12 mL 二氯甲烷)脱附;污水用 75 mL (15 mL 丙酮+60 mL 二氯甲烷)脱附。解脱液收集于已联接 K-D 蒸发瓶(3.4.5)的 K-D 浓缩瓶(3.4.4)中,加入两粒沸石(3.6),安装好三球 Snyder 柱(3.4.6)、待浓缩。

4.3.2.3 试样的浓缩:将 K-D 浓缩装置的下端浸入通风橱中的水浴锅(3.7)中,在 65~70 °C 的水温下浓缩至约 0.5 mL,从水浴锅上移下 K-D 浓缩装置,冷却至室温,取下三球 Snyder 柱,用少量丙酮洗柱及其玻璃接口,洗涤液流入浓缩瓶中。加入一粒新沸石,装上二球 Snyder 柱(3.4.7),在水浴锅中如上述浓缩,定容至 0.3~0.5 mL,留待 HPLC 分析。

注:甲醇、环己烷、二氯甲烷及丙酮等是易燃的有机溶剂,应在通风橱中操作。

5 操作步骤

5.1 调整仪器

安装高效液相色谱仪,使其达到预期的分离效果,预热运转至获得稳定的基线。

5.1.1 柱温: 35℃。

5.1.2 流动相组成:

A 泵: 85% 水(2.1.2)+15% 甲醇(2.1.1)(V/V)。

B 泵: 100% 甲醇(2.1.1)。

5.1.3 洗脱: 视柱的性能可采用下列方式的一种进行洗脱,或按柱的性能选择条件。

5.1.3.1 恒溶剂洗脱: 以 92% B 泵和 8% A 泵流动相组成,等浓度洗脱。

5.1.3.2 梯度洗脱:

以 60% B 泵+40% A 泵的组成洗脱,保持 20 min;

以 3% B/min 增量至成为 96% B+4% A 泵的组成,保持至出峰完。

以 8% B/min 减量至成为 60% B 泵+40% A 泵的组成,保持 15 min,使流动相组成恒定,为下一次进样准备好条件。

5.1.4 流动相流量: 30 mL/hr 恒流;或按柱的性能选定流量。

5.1.5 检测器:

5.1.5.1 荧光检测器(3.1.3)波长的选择:

a. 荧光分光光度计检测器: 六种 PAH 在荧光分光光度计特定的条件下最佳的激发和发射波长如表 1。

表 1 六种多环芳烃最佳的荧光激发和发射波长

化 合 物	激发波长 λ_{ex} , nm	发射波长 λ_{em} , nm
荧蒽	365	462
苯并(b)荧蒽	302	452
苯并(k)荧蒽	302	431
苯并(a)芘	297	450 或 430
苯并(ghi)芘	302	419 或 407
茚并(1,2,3-cd)芘	300	500

水样中含茚并(1,2,3-cd)芘时选 $\lambda_{ex}=340$ nm, $\lambda_{em}=450$ nm 较好,在此波长下茚并(1,2,3-cd)芘的荧光强度较高;否则选 $\lambda_{ex}=286$ nm, $\lambda_{em}=430$ nm 对苯并(a)芘灵敏度较高。

b. 荧光计检测器: 单色光荧光计使用 $\lambda_{ex}=300$ nm, $\lambda_{em}=460$ nm 为适宜;滤色器荧光计在 $\lambda_{ex}=300$ nm, $\lambda_{em}>370$ nm 下测定。

5.1.5.2 紫外检测器(3.1.4): 在 254 nm 下检测 PAH。

以上几种检测器可以单独使用;亦可以把荧光和紫外两种检测器串联使用。

5.1.6 记录器:

5.1.6.1 放大: 根据样品中被测组分含量调节记录仪放大档,使谱图在记录纸量程内。

5.1.6.2 纸速: 0.25 cm/min。

5.2 校准

5.2.1 用外标法定量。

5.2.2 标准样品:

5.2.2.1 标准样品的制备: 在线性范围内用混合 PAH 标准溶液(2.2.10.3)配制几种不同浓度的标准溶液,其中最低浓度的溶液浓度应稍高于最低检测限。

5.2.2.2 高效液相色谱法中使用标准样品的条件:

a. 标准样品与试样进样体积最好相同,两者的响应值也要相近。

b. 在工作范围内,相对标准偏差 $<10\%$ 。

c. 标准样品与试样应尽可能同时进行分析。

5.2.2.3 使用次数:每个工作日必须测定一种或几种浓度的标准溶液来检验校准曲线或响应因子。如若某一化合物的响应值与预期值间的偏差大于 10% ,则必须用新的标准对该化合物绘制新的校准曲线或求出新的响应因子。

5.2.3 校准数据的表示:以响应值对进样量作校准曲线,可得一条通过原点的直线。响应值与进样量的比值为—常数,可用平均比值或响应因子代替标准曲线来计算测定结果。

5.3 测定

5.3.1 进样

5.3.1.1 进行方式:以注射器人工进样。

5.3.1.2 进样量: $5\sim 25\ \mu\text{L}$ 。

5.3.1.3 操作:用试样(4.3.2.3)润湿微量注射器(3.1.6)的针头及针筒,并洗涤三次。抽取样品,排出针筒中的气泡。迅速注射样品至 HPLC 的柱头,进行 HPLC 分析。

5.3.2 记录

5.3.2.1 放大和纸速:记录下放大倍数及纸速。

5.3.2.2 组分的色谱峰:以标样核对,记下色谱峰的保留时间及对应的化合物。

5.3.2.3 基线漂移:记下漂移值。

5.4 色谱图的考察

5.4.1 标准色谱图

不同填料的色谱柱,化合物出峰的顺序有所不同,下图为两种不同检测器串联的十六种 PAH 标准色谱图。图 1 为紫外检测器在波长 $254\ \text{nm}$ 下的色谱图;图 2 为荧光分光光度计在 $\lambda_{\text{ex}}=286\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=430\ \text{nm}$ 下的色谱图。多环芳烃标样浓度十六种化合物皆为 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$,进样量 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

荧光强度

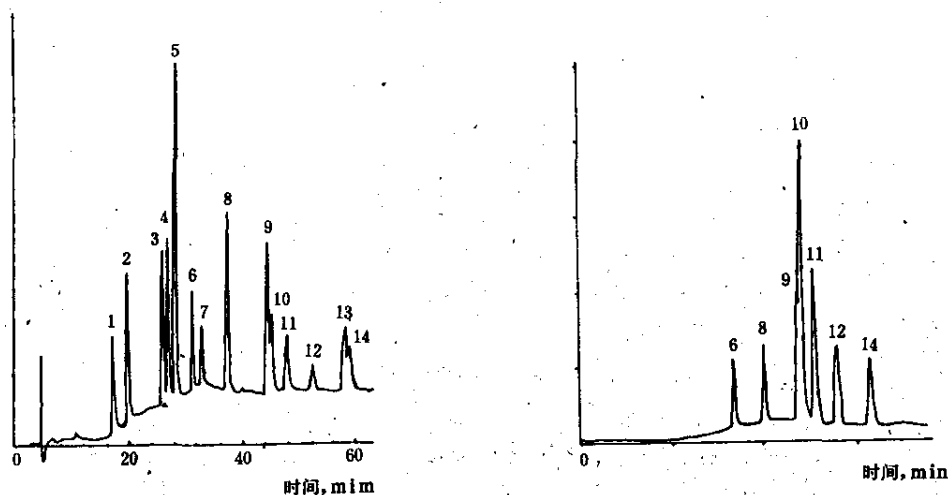


图 1 十六种 PAH 标样的 HPLC 紫外谱图 图 2 十六种 PAH 标样的 HPLC 荧光谱图

5.4.2 定性分析

5.4.2.1 各组分的洗脱次序:以标准谱图相对照。图 1 和图 2 为十六种 PAH 标样在 Zorbax ODS 柱的 HPLC 图,出峰顺序为 1. 萘, 2. 苊烯, 3. 苊+芴, 4. 菲, 5. 蒽, 6. 荧蒽, 7. 芘, 8. 苯并(a)蒽+枹, 9. 苯并(b)荧蒽, 10. 苯并(k)荧蒽, 11. 苯并(a)芘, 12. 二苯并(a,h)蒽, 13. 苯并(ghi)芘, 14. 茚并(1,2,3-cd)芘。

5.4.2.2 保留值:以试样的保留时间和标样的保留时间相比较来定性。用作定性的保留时间窗口宽度

以当天测定标样的实际保留时间变化为基准。用一个化合物保留时间标准偏差的三倍计算设定的窗口宽度。

5.4.2.3 鉴定的辅助方法：可用加标样使峰高叠加的方法；或用停泵扫描，测定各组分荧光激发和发射谱图与对应标样的荧光图对比的办法来帮助鉴定化合物。

5.4.3 定量分析

5.4.3.1 色谱峰的测量

连接峰的起点与终点之间的直线作为峰底，以峰最大值到峰底的垂线为峰高。垂线在时间坐标上的对应值为保留时间。通过峰高的中点作平行峰底的直线，此直线与峰两侧相交，两点之间的距离为半高峰宽。峰与峰底之间的面积为峰面积，等于峰底乘半高峰宽。

5.4.3.2 计算(外标法)

$$X_i = \frac{A_i \cdot B_i \cdot V_i}{V_i \cdot V_s}$$

式中： X_i ——试样中组分 i 的含量， $\mu\text{g/L}$ ；

A_i ——标样中组分 i 进样量对其峰高(或峰面积)的比值， ng/mm (或 ng/mm^2)；

B_i ——样品中组分 i 的峰高(或峰面积)， mm (或 mm^2)；

V_i ——萃取液浓缩后的总体积， μL ；

V_i ——注射样品的体积， μL ；

V_s ——水样体积， mL 。

6 结果的表示

6.1 定性结果

根据标准色谱图各组分的保留时间，确定出被测试样中存在的组分数目和组分的名称。

6.2 定量结果

6.2.1 含量的表示方法：按 5.4.3.2 公式计算出水样中 PHA 的含量，以 $\mu\text{g/L}$ 表示。

6.2.2 精密度：见表 2。

表 2 不同实验室测定的精密度(再现性)

PAH	实 验 室 编 号 项 目	1	2	3	4	5	6	7
荧 蒽	测定平均值, ng/L	2.4	1.4	72.4	4.9 $\mu\text{g/L}$	16.9	42.8	15.2
	变异系数, %	2	6	4	10	15	13	3
	测定次数	3	6	3	6	6	6	6
苯并(b)蒽	测定平均值, ng/L	5.3	1.4	8.8	2.9 $\mu\text{g/L}$	36.0	24.2 ⁽¹⁾	40.1 ⁽¹⁾
	变异系数, %	16	12	7	8	22	11	3
	测定次数	3	6	3	6	6	6	6
苯并(k)蒽	测定平均值, ng/L	3.5	1.5	4.6	3.3 $\mu\text{g/L}$	31.8		
	变异系数, %	3	6	7	10	16		
	测定次数	3	6	3	6	6		
苯并(a)比	测定平均值, ng/L	5.5	2.2	6.0	3.9 $\mu\text{g/L}$	42.6	3.3	23.7
	变异系数, %	5	8	6	4	15	17	3
	测定次数	3	6	3	6	6	6	6

续表 2

PAH	实 验 室 编 号 项 目	1	2	3	4	5	6	7
茚并 (1,2,3-cd) 比 ⁽²⁾	测定平均值, ng/L	34.8						10.3
	变异系数, %	10						6
	测定次数,	4						6
苯并 (ghi) 芘	测定平均值, ng/L	2.7	4.3	59.7	3.1 μ g/L	63.5	48.3	24.7
	变异系数, %	4	9	7	4	12	19	8
	测定次数	3	6	3	6	6	6	6

注: (1) 为苯并(b)荧蒹+苯并(k)荧蒹数据。

(2) 空格表示未检出或分不开按苯并(ghi)芘算。

6.2.3 准确度: 见表 3。

表 3 各实验室准确度(地表水加标回收率)测定汇总

PAH	实 验 室 编 号 项 目	1	2	3	4	5	6	7
荧蒹	加标量, ng/L	48	0.82	64.5	2.5	11	109	11.0
	平均回收率, %	70	67	92.3	98	59	90	94
苯并 (b) 荧蒹	加标量, ng/L	34.2	1.5	12.5	5.6	20	150	39.1
	平均回收率, %	98	81.7	101	86	109	106	94
苯并 (k) 荧蒹	加标量, ng/L	46.8	1.4	12	4.5	19.1		
	平均回收率, %	91	86	97	82	84		
苯并 (a) 芘	加标量, ng/L	72.0	1.9	21.1	7.2	25.4	117	25.4
	平均回收率, %	80	90	93	93	72	62	93
茚并 (1,2,3-cd) 芘 ⁽¹⁾	加标量, ng/L	34.8						28.8
	平均回收率, %	83						86
苯并 (ghi) 芘	加标量, ng/L	55.2	98	69.0	1.9	38.8	300	10.8
	平均回收率, %	96	91	87	79	93	86	95

注: (1) 空格表示未检出或分不开, 按苯并(ghi)芘算。

6.2.4 检出限: 以 HPLC 最灵敏档噪音的五倍作为仪器的检出限。

附录 A

六种特定多环芳烃的名称、结构及其在自然界的分布
(补充件)

多环芳烃几乎存在于所有的水中,可以在水中成为溶液或为微粒物质(悬浮性固体、沉积物)所吸附。下表所列特定的六种多环芳烃用作天然水和污水中存在的一大类多环芳烃的指示物。世界卫生组织拟定了饮用水中表列的六种特定多环芳烃总的最高可接受的水平为 200 ng/L。这一标准也已为欧洲经济共同体所采纳。

各种不同水中,六种多环芳烃总的代表性数值如下:

地下水 最高达 50 ng/L

地面水 最高达 1 µg/L

废水 最高达 100 µg/L

表 A1 六种特定多环芳烃的名称和结构式

名称	结构	名称	结构
荧蒽 Fluorathene (FLU)		苯并(a)芘 Benzo(a)Pyrene (BaP)	
苯并(b)荧蒽 Benzo(b) fluorathene (BbF)		苯并(ghi)茈 Benzo(ghi) Perylene (BghiPe)	
苯并(k)荧蒽 Benzo(k) fluorathene (BkF)		茈并(1,2,3-cd)芘 Indeno(1,2,3-cd) Pyrene (I 123 cdP)	

附录 B

环己烷的净化方法
(补充件)

B1 浓硫酸净化

将环己烷与浓硫酸(2.2.9)共振摇,用试剂水(2.1.2)洗涤,经无水硫酸钠(2.2.4)干燥后进行蒸馏。

B2 柱层析净化

在一根具有玻璃活塞的玻璃柱(3.4.3.1)内,先加入 I 级活性碱性氧化铝(2.2.6)50 g,再从顶端加入 20 g 干燥硅胶(2.2.8),两种吸附剂都以干品加入。用分液漏斗从柱顶端慢慢加入环己烷。通过柱的最初 50 mL 环己烷再从柱的顶端重新加入。在一般情况下一支柱可纯化 2.5 L 环己烷。若柱上出现黄色区带,就必须停止过柱,更换柱填料。

附加说明:

本标准由国家环境保护局科技标准司标准处提出。

本标准由北京环境保护监测中心负责起草。

本标准主要起草人涂洁莹。

本标准委托中国环境监测总站负责解释。