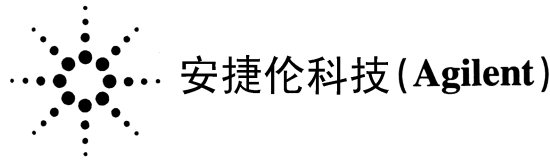


孔晔, 曹喆. 采用安捷伦 5977B GC-MS 测定土壤中硝基苯类化合物含量[J]. 环境化学, 2017, 36(5): 1166-1170.
KONG Ye, CHAO Zhe. Determination the content of nitrobenzene compounds in soil by using Agilent 5977B GC-MS[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(5): 1166-1170.



采用安捷伦 5977B GC-MS 测定土壤中硝基苯类化合物含量

孔 晔 曹 喆

(安捷伦科技(中国)有限公司, 北京, 100102)

摘 要 本文采用安捷伦 7890B_5977B GC-MS 测定土壤样品中的硝基苯类化合物含量. 样品前处理方法以及仪器分析方法参考《GC-MS 测定半挥发性有机物》(EPA method 8270D) 和土壤样品前处理标准 HJ 783—2016 规定的样品前处理要求和仪器分析条件. 分别采用两种加压快速溶剂萃取的提取方法, 结合弗罗里硅土净化法, 对土壤样品进行提取与净化, 建立了详细的前处理步骤并对处理过程中的要点进行描述. 此方法成功应用于土壤中 14 种硝基苯类化合物的分析测定, 样品加标回收率达到了 73%—104% (标准要求 40%—150%), 仪器最低检出限为 1.3—2.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 方法检出限为 1.4—2.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.
关键词 土壤, 硝基苯类化合物, GC-MS, 检出限, 回收率.

硝基苯类化合物(硝基苯、间硝基甲苯、对硝基甲苯等)广泛应用于医药、农药、炸药、染料、造纸、纺织等工业领域, 是一类重要的苯类化合物, 其结构稳定, 种类多且复杂, 难以降解. 硝基苯类化合物被美国 EPA 列为“优先污染物”, 同时也被我国列入环境优先污染物“黑名单”. 鉴于硝基苯类化合物的高毒性特点, 不仅对环境污染严重, 同时对人体也存在高致畸、致癌风险; 因此加强环境中硝基苯类同系物的分析与检测也变至关重要.

2016 年 5 月 31 日, 为切实加强土壤污染防治, 逐步改善土壤环境质量, 《土壤污染防治行动计划》(简称“土十条”) 正式由国务院印发实施. 此次详查对检测项目、分析方法和参考标准做了明确的规定, 共包括土壤、地下水和农产品(小麦/水稻)等 3 个检测领域, 其中土壤污染物包括无机污染物(氟化物、氰化物和 15 种重金属)、有机污染物(10 种)和理化性质(5 项); 地下水污染物包括无机污染物和有机污染物(项目同土壤). 其中关于土壤中硝基苯类化合物的测定, 采用《GC-MS 测定半挥发性有机物》(EPA method 8270D) 测试方法.

为了配合国家关于“土十条”中硝基苯类化合物检测的实施, 安捷伦推出了针对《GC-MS 测定半挥发性有机物》(EPA method 8270D) 检测方法的一整套检测方案, 作为日常检测的参照.

1 实验部分

1.1 试剂和样品

丙酮(农残级)、正己烷(农残级)、二氯甲烷(农残级). 干燥剂: 粒状硅藻土(散装 1 kg)在马弗炉中 450 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 h 后冷却, 置于干燥器内玻璃瓶中备用. 正己烷-丙酮混合溶剂: 1:1 (V/V)、正己烷-二氯甲烷混合溶剂: 1:9 (V/V)、硝基苯标准使用液: 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、内标使用液: 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、替代物使用液: 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、弗罗里硅土 SPE 净化小柱: 1000 mg, 6 mL. 弗罗里硅土填料: 在马弗炉中 450 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 h 后冷却, 置于干燥器内玻璃瓶中备用.

1.2 样品采集与保存

土壤样品按照 HJ/T 166 的相关要求采集和保存, 沉积物样品按照 GB 17378.3 的相关要求采集和保存.

去除样品中的异物, 称取约 5 g (精确到 0.01 g) 样品双份, 土壤样品一份按照 HJ613 方法测定干物质含量, 另一份加入适量硅藻土(2.5—3 g), 研磨均化成流砂状. 沉积物样品一份按照 GB17378.5 测定含水量, 另一份按照土壤样品脱水. 如水分含量较高, 可以采用冻干法进行脱水.

1.3 样品前处理

1.3.1 加压流体萃取——使用第一种萃取方法

研磨好的试样填入萃取池中, 要求填满萃取池空间, 以正己烷-丙酮混合溶剂 1+1 (V/V) 为提取溶剂. 萃取温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 萃取压力 1500 psi, 静态萃取时间 5 min, 淋洗为 60% 池体积, 氮气吹扫时间 60 s, 萃取循环次数 2 次. 收集提取溶液. 收集萃取溶液后氮吹, 吹至近干, 正己烷 1 mL 复溶后准备净化.

选择弗罗里硅土净化小柱,手动净化.使用 12 mL 10% 正己烷/二氯甲烷(1:9)淋洗氟罗里硅小柱,流速为液滴自然淋洗速度;之后使用 12 mL 正己烷淋洗小柱,流速为液滴自然淋洗速度.在正己烷液面消失之前,将置换为正己烷溶剂的样品加入活化好的净化柱上,之后待样品被小柱吸附后使其流速为 0,静置 2 min 后,打开流速控制器,通过液体流速阀控制其流速,使其流速始终控制在 20 滴·min⁻¹;使用少量正己烷溶剂多次洗涤浓缩瓶,洗涤液一并转移至净化柱上,收集淋洗液.使用二氯甲烷:正己烷=90:10 的淋洗液 12 mL 淋洗,淋洗速度控制在 20 滴·min⁻¹,待所有淋洗液淋洗结束后,使用加压注射器多次压出存留于净化柱上的淋洗液,收集所有淋洗液.吹至近干,正己烷复溶,加入内标,定容至 1 mL,之后,上 GC-MS 准备分析.

1.3.2 加压流体萃取——使用第二种萃取方法

由于硝基苯类化合物的挥发性较强,因此在氮吹步骤和 SPE 净化的过程中,都会带来较大的损失,从而影响样品的回收率.本文通过大量实验比对,开发了一种新的 ASE 萃取方案,通过在 ASE 萃取池的底部首先添加一定量的弗罗里硅土,然后再填充土壤与硅藻土的混合样品,结合合适极性的提取溶剂,实现一步操作,完成提取,净化两步效果,从而减少了操作步骤,控制了硝基苯类化合物的损失,确保分析的准确性.称取 1 g 高温处理过的弗罗里硅土,首先填入萃取池底部,之后称取 5 g 土壤与 1.5 g 硅藻土研磨均匀后试样填入萃取池中,要求填满萃取池空间,以正己烷-二氯甲烷混合溶剂 1+9(V/V)为提取溶剂.萃取温度 100 ℃,萃取压力 1500 psi,静态萃取时间 5min,淋洗为 60%池体积,氮气吹扫时间 60 s,萃取循环次数 2 次.收集提取溶液.吹至近干,正己烷复溶,加入内标,定容至 1 mL,之后,上 GC-MS 准备分析.

1.4 仪器分析条件

气相色谱条件:Agilent 7890B GC,DB-5MS UI 毛细管柱 30 m×0.25 mm×0.25 μm (p/n: 122-5532 UI).程序升温:初温 40 ℃,保持 4 min,以 10 ℃·min⁻¹升至 300 ℃,保持 2 min.载气:氮气;恒流模式,1.0 mL·min⁻¹;进样口温度:MMI 进样口,采用程序升温进样模式,60 ℃保持 0.05 min,以 750 ℃·min⁻¹升温至 280 ℃.进样方式:不分流进样,进样量:1.0 μL,传输线温度:280 ℃

质谱条件:质谱仪:Agilent 5977B MSD (Inert Plus 离子源),离子源:电子轰击源,70 eV,离子源温度:280 ℃,四极杆温度:180 ℃,溶剂延迟:6.0 min,EM 电压:Gain factor 1,扫描方式:Sim+Scan.

表 1 化合物保留时间,定量和定性离子

序号	化合物中文名称	内标名称	RT/min	定量离子	定性离子 1	定性离子 2
1	硝基苯-D5(替代物标准品)	萘-D8	11.6	128.1	82.1	98.1
2	硝基苯	萘-D8	11.7	123.0	77.1	93.0
3	2-硝基甲苯	萘-D8	12.9	120.0	91.1	92.1
4	萘-D8(内标)		13.3	136.2	108.1	134
5	4-硝基甲苯	萘-D8	13.5	137.1	91.1	107.1
6	对硝基氯苯	萘-D8	13.9	157.0	159.0	111.0
7	间硝基氯苯+邻硝基氯苯	萘-D8	14.1	157.0	159.0	111.0
8	2-氟联苯(替代物标准品)	萘-D8	15.9	172.1	171.1	173.1
9	对二硝基苯	萘-D10	16.8	168.0	122.0	75.0
10	间二硝基苯	萘-D10	16.9	168.0	122.0	76.0
11	2,6-二硝基甲苯	萘-D10	17.0	148.0	165.0	89.0
12	邻二硝基苯	萘-D10	17.1	168.0	76.0	63.0
13	萘-D10(内标)		17.5	162.2	164.2	160.1
14	2,4-二硝基甲苯	萘-D10	18.0	165.0	119.0	89.0
15	1-氯-2,4-二硝基甲苯	萘-D10	18.3	202.0	204.0	110.0
16	3,4-二硝基甲苯	萘-D10	18.6	182.0	94.0	89.0
17	2,4,6-三硝基甲苯(TNT)	萘-D10	19.9	210.0	193.0	180.0

2 结果与讨论

2.1 色谱分析结果以及基质干扰对分析结果

18 种硝基苯类化合物色谱图分离情况(含内标和替代物)见图 1.

由于基质效应对不同化合物会造成不同的影响,因此在土壤分析中如果希望得到准确可靠的分析结果,就必须对基质效应进行合理的判定.实验结果显示,土壤基质对硝基苯类化合物均存在明显的基质增强效应.具体表现在:纯溶剂配制的标样响应值明显低于用基质配制的标样响应值,如:2,6-二硝基甲苯在溶剂配制的标准品中和基质中其定量离子和定性离子的响应至少有几倍差异.对于内标物质其响应的区别不大.如:内标萘-D10,在溶剂配制的标准品中和基质中其定量离子和定性离子的响应值基本相同(表 2).鉴于此,本次实验需要使用带基质的标准曲线来进行定量分析和样品添

加回收率的计算.

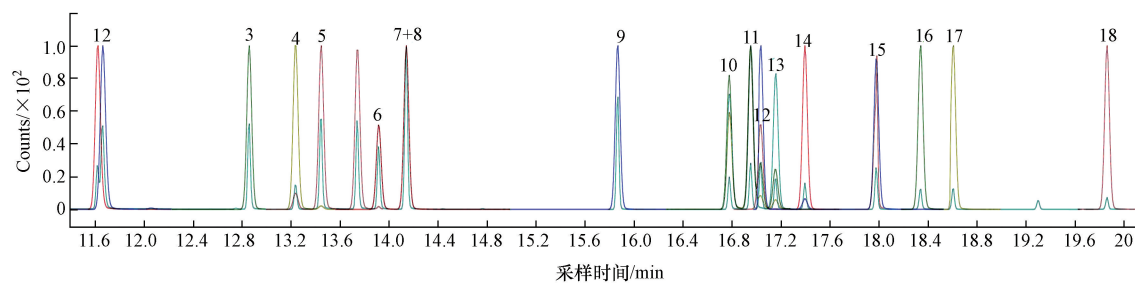


图 1 17 种硝基苯类化合物 在 DB-5MS UI 色谱柱上的分离情况(含内标和替代物)

1. 硝基苯-D5(替代物标准品);2. 硝基苯;3. 2-硝基甲苯;4. 萘-D8(内标);5. 4-硝基甲苯;6. 对硝基氯苯;
7+8. 间硝基氯苯+邻硝基氯苯;9. 2-氟联苯(替代物标准品);10. 对二硝基苯;11. 间二硝基苯;12. 2,6-二硝基甲苯;13. 邻二硝基苯;
14. 范-D10(内标);15. 2,4-二硝基甲苯;16. 1-氯-2,4-二硝基甲苯;17. 3,4-二硝基甲苯;18. 2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)

表 2 纯溶剂配制与基质配制的 2,6-二硝基苯和范-D₁₀ 的响应值

2,6-二硝基苯	m/z	溶剂中丰度	基质中丰度	范-D ₁₀	m/z	溶剂中丰度	基质中丰度
定量离子	165	2379	29216	定量离子	164	12036	12836
定性离子 1	166	316	3631	定性离子 1	162	11816	11897
定性离子 2	89	1615	3715	定性离子 2	160	5646	5701

2.2 仪器的最低检出限 (IDL) 以及方法的最低检出限 (MDL)

IDL 是指仪器在指定可信度的条件下能检测到分析物的最低信号或最低含量.IDL 与重复进样所测得的峰面积响应的标准偏差 STD 以及置信因子 t_{α} 有关.计算得到相对标准偏差 ($RSD=STD/\text{平均值}$) 的情况下,IDL 可以用进样的标样量的单位 (ng、pg 或 fg) 表示,如使用置信水平为 99% ($1-\alpha=0.99$) 的 Student- t 检验来统计 8 次连续进样的 RSD%,计算出 IDL:

$$IDL=(t_{\alpha})(RSD\%)(\text{标样量})$$

采用 20 ng·mL⁻¹浓度的基质配标标准溶液作为 IDL 测试溶液,计算 8 次重复进样(自由度 $n=7$)并在置信水平 99% 的条件下,从 t -表查得 $t_{\alpha}=2.998$,因此,硝基苯 $IDL=(2.998)\times(3.8\%)\times(20\text{ pg})=0.23\text{ pg}$,其他 12 个化合物的 IDL 计算结果见表 3.

MDL 是指在通过分析方法的全部处理和测定过程之后(包括:样品制备和样品测定),被测定物质产生的信号能以 99%置信度区别于空白样品而被测定出来的最低浓度.方法的检出限与仪器的检出限相似,但考虑了样品分析前的所有制备过程的影响.

$$MDL=(3.14)(RSD\%)(\text{标样量})$$

采用 20 ng·mL⁻¹浓度的基质配标标准溶液作为 MDL 测试溶液,计算 8 次重复进样(自由度 $n=7$)并在置信水平 99% 的条件下,使用安捷伦 Masshunter 定量分析软件,自动分析计算硝基苯 $MDL=(3.14)\times(3.7\%)\times(20\text{ pg})=2.32\text{ pg}$,其他 13 个化合物的 IDL 计算方法与此一致,计算结果详见表 3.

表 3 14 种硝基苯类化合物仪器的最低检出限 (IDL) 和方法的最低检出限 (MDL)

名称	RT/min	样品进样量	样品 RSD%	IDL/pg	MDL/pg
硝基苯	11.7	20 pg	3.7	2.22	2.32
2-硝基甲苯	12.9	20 pg	2.2	1.32	1.38
4-硝基甲苯	13.5	20 pg	2.8	1.68	1.76
对硝基氯苯	13.9	20 pg	2.4	1.44	1.51
间硝基氯苯+邻硝基氯苯	14.1	20 pg	2.7	1.62	1.70
对二硝基苯	16.8	20 pg	3.7	2.22	2.32
间二硝基苯	16.9	20 pg	3.8	2.28	2.39
2,6-二硝基甲苯	17.0	20 pg	3	1.80	1.88
邻二硝基苯	17.1	20 pg	3.9	2.34	2.45
2,4-二硝基甲苯	18.0	20 pg	3	1.80	1.88
1-氯-2,4-二硝基苯	18.3	20 pg	2.6	1.56	1.63
3,4-二硝基甲苯	18.6	20 pg	2.7	1.62	1.70
2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)	19.9	20 pg	3.3	1.98	2.07

2.3 标准曲线绘制

分别配置 14 种硝基苯标准品标准曲线,浓度为 20、50、100、500、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5 个浓度点,同时分别加入内标标准液,浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,替代物标准液,浓度为 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,配制标准曲线采用基质溶液稀释标准样品,以避免基质效应所带来的定量误差.平均响应因子相对标准偏差要求 $\leq 30\%$ (表 4).

相对响应因子

$$\text{RRFi}=\frac{A_{\text{s}}\rho_{\text{is}}}{A_{\text{is}}\rho_{\text{s}}};$$

平均相对响应因子

$$\overline{\text{RRF}}=\frac{\sum_{i=1}^n\text{RRF}_i}{n}$$

式中: A_{s} 为目标化合物峰面积; A_{is} 为内标化合物峰面积; ρ_{s} 为目标化合物浓度; ρ_{is} 为内标化合物浓度.

表 4 14 种硝基苯类化合物标准曲线方程及平均响应因子相对标准偏差

名称	标准曲线方程	相关系数 R^2	平均响应因子 RSD%
硝基苯	$y=0.067110x-0.003804$	0.9998	5.4
2-硝基甲苯	$y=0.076629x-0.006645$	0.9996	8.8
4-硝基甲苯	$y=0.061850x-0.006250$	0.9995	11.4
对硝基氯苯	$y=0.045894x-0.006228$	0.9990	15.4
间硝基氯苯+邻硝基氯苯	$y=0.045899x-0.006235$	0.9990	15.4
对二硝基苯	$y=0.089526x-0.013447$	0.9988	17.5
间二硝基苯	$y=0.040080x-0.004551$	0.9990	11.3
2,6-二硝基甲苯	$y=0.051150x-0.007015$	0.9983	13.7
邻二硝基苯	$y=0.090492x-0.014713$	0.9980	17.6
2,4-二硝基甲苯	$y=0.045824x-0.007870$	0.9985	21.0
1-氯-2,4-二硝基苯	$y=0.082809x-0.010270$	0.9989	12.5
3,4-二硝基甲苯	$y=0.028653x-0.003914$	0.9990	15.6
2,4,6-三硝基甲苯	$y=0.036281x-0.005821$	0.9984	18.3
硝基苯	$y=0.031954x-0.004044$	0.9997	19.5

注: y 为目标化合物与内标化合物的丰度之比; x 为目标化合物与内标化合物的浓度之比.

2.4 样品添加回收率

2.4.1 使用第一种萃取方法分析

分别称取 5 g 样品,进行加标实验,加标浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,替代物标准品加标浓度为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每个加标浓度制作 6 个平行样品.按照第一种萃取方法进行提取和净化,最终定容至 1 mL,加内标上机分析.计算样品加标回收率的值时,标准曲线采用基质配标进行计算,每组 6 个平行样品实测值的相对标准偏差计算:

相对标准偏差(%)

$$=x=\frac{\text{测定值的标准偏差}(n=6)}{\text{测定值的平均值}(n=6)}\times 100\%$$

从回收率结果发现(表 5),使用第一种萃取方法所有化合物回收率平均值均在 54%—108%之间,替代物标准品硝基苯-D5 加标回收率平均值为 50.6%,2-氟联苯加标回收率平均值为 67%,完全符合标准中要求的加标样品回收率控制范围:40%—150% 的质控要求.对 6 次平行分析样品的色谱图进行叠图查看,发现化合物的重现性非常一致,同时将 6 次分析的结果计算其 RSD%,所有化合物的相对标准偏差均小于 7.6%,进一步验证方法的稳定性.

表 5 14 种硝基苯类化合物(加标浓度 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和 2 种替代物标准品
(加标浓度 80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)样品回收率结果(%, $n=6$)

化合物名称	回收率 1	回收率 2	回收率 3	回收率 4	回收率 5	回收率 6	回收率 平均值	RSD
硝基苯-D5 (SS)	49.9	50.1	48.3	54.8	46.9	53.7	50.6	6.1
硝基苯	69.2	69.2	65.7	76.2	67.2	72.6	70.0	5.4
2-硝基甲苯	53.1	54.4	57.1	51.7	54.9	55.1	54.4	3.4
4-硝基甲苯	54.9	58.0	60.2	58.0	56.9	56.9	57.5	3.1
对硝基氯苯	54.1	54.4	60.2	59.3	52.0	56.4	56.1	5.7
间硝基氯苯+邻硝基氯苯	56.0	56.3	58.7	61.3	54.0	60.2	57.8	4.8
2-氟联苯 (SS)	64.8	66.2	69.4	68.6	67.0	66.5	67.1	2.5
对二硝基苯	100.1	108.6	113.6	98.9	114.2	99.9	105.9	6.7
间二硝基苯	84.8	95.2	80.6	98.4	95.3	94.2	91.4	7.7

续表5

化合物名称	回收率 1	回收率 2	回收率 3	回收率 4	回收率 5	回收率 6	回收率 平均值	RSD
2,6-二硝基甲苯	79.0	69.8	77.4	76.8	76.3	73.9	75.5	4.3
邻二硝基苯	81.2	91.5	76.0	79.3	88.3	87.1	83.9	7.1
2,4-二硝基甲苯	103.0	94.8	94.2	99.9	110.1	101.4	100.6	5.8
1-氯-2,4-二硝基苯	93.5	91.2	90.9	94.2	107.4	86.7	94.0	7.5
3,4-二硝基甲苯	104.6	99.3	102.9	101.8	107.6	101.6	103.0	2.8
2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)	113.4	96.7	109.3	101.7	119.3	105.3	107.6	7.6

2.4.2 使用第二种萃取方法分析

称取 5 g 样品,进行加标实验,加标浓度为 20 μg·kg⁻¹, 替代物标准品加标浓度为 80 μg·kg⁻¹,每个加标浓度制作2 个平行样品.按照第二种萃取方法提取和浓缩,加内标定容至 1 mL,上机分析.计算样品加标回收率的值时,标准曲线采用基质配标进行计算.每组 2 个平行样品实测值的相对标准偏差计算:

$$\text{相对标准偏差}(\%) = x = \frac{\text{测定值的标准偏差}(n=6)}{\text{测定值的平均值}(n=6)} \times 100\%$$

使用第二种萃取方法,所有化合物回收率结果保持在 73%—104%之间,替代物标准品硝基苯-D5 和 2-氟联苯加标回收率平均值分别为 62%和 79%(表 6).

表 6 14 种硝基苯类化合物(加标浓度 20 μg·kg⁻¹)和 2 种替代物标准品(加标浓度 80 μg·kg⁻¹)回收率结果(%,n=2)

化合物名称	回收率 1	回收率 2	平均值	标准偏差	RSD
硝基苯-D5 (SS)	62.3	61.5	61.9	0.59	0.96
硝基苯	73.4	73.0	73.2	0.27	0.37
2-硝基甲苯	75.3	72.9	74.1	1.70	2.29
4-硝基甲苯	76.4	74.1	75.2	1.61	2.14
对硝基氯苯	77.9	76.2	77.0	1.21	1.57
间硝基氯苯+邻硝基氯苯	79.5	78.6	79.0	0.62	0.79
2-氟联苯(SS)	80.6	77.2	78.9	2.40	3.05
对二硝基苯	85.3	90.0	87.7	3.32	3.79
间二硝基苯	94.0	96.6	95.3	1.79	1.88
2,6-二硝基甲苯	106.9	101.5	104.2	3.84	3.68
邻二硝基苯	90.3	93.4	91.8	2.21	2.41
2,4-二硝基甲苯	92.3	91.6	92.0	0.52	0.56
1-氯-2,4-二硝基苯	91.1	94.9	93.0	2.66	2.86
3,4-二硝基甲苯	102.0	96.6	99.3	3.79	3.82
2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)	97.9	93.9	95.9	2.82	2.94

3 结论

本文完整再现了 EPA method 82700《GC-MS 测定半挥发性有机物》和《全国土壤污染状况详查土壤样品分析测试方法技术规定》中硝基苯类化合物的分析流程,并根据硝基苯类化合物的性质特点,在不改变标准方法的基础上全面优化了前处理过程中造成化合物损失的关键步骤,从而使得优化后的方法一完全满足法规中的质控要求,方法二则实现一步操作完成提取和净化的两个程序,使得方法具有前处理步骤简单,提取溶剂选择合理的特点,既保证了目标物的充分提取,又有效减少了土壤中干扰物质,样品平行处理的稳定性也明显优于方法一,可以为广大实验者提供更为简单可靠的硝基苯分析解决方案.