

· 监测技术 ·

超声波提取 - GC/MS 法测定生物体内硝基苯类化合物

张莉, 周卫华, 王兆群

(淮安市环境监测中心站, 江苏 淮安 223001)

摘要: 以洪泽湖中6种代表性生物为研究对象, 采用超声波法提取样品中硝基苯类化合物, 用凝胶色谱净化、浓缩, 气相色谱/质谱联用法测定。该法与索氏提取法在同等试验条件下进行加标回收试验, 前者回收率高且稳定, 简便可行。方法检出限为 $0.008 \mu\text{g/g} \sim 0.030 \mu\text{g/g}$, 平均加标回收率为 $76.5\% \sim 109\%$, 重复测定3次的RSD为 $1.5\% \sim 13.0\%$ 。

关键词: 硝基苯类化合物; 超声波提取; 凝胶色谱; 气相色谱/质谱联用法; 生物体

中图分类号: O657.63 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-2009(2013)05-0019-04

Ultrasonic-GC/MS Method for the Determination of Nitrobenzene Compounds in Biological Samples

ZHANG Li, ZHOU Wei-hua, WANG Zhao-qun

(Huai'an Environmental Monitoring Central Station, Huai'an, Jiangsu 223001, China)

Abstract: Six representative biological samples from Hongze Lake were selected as researching objects. Nitrobenzene compounds in biological samples were extracted by ultrasonic extraction. Gel chromatography was applied to cleanup and concentration and quantification was done by GC/MS. Compared with the recoveries of the ultrasonic method and soxhlet extraction method under the same experimental conditions, the former method showed better recoveries and more stable. The detection limits were $0.008 \mu\text{g/g} \sim 0.030 \mu\text{g/g}$. The average spike recovery were from 76.5% to 109% , and the RSDs of three times repeated measurements were from 1.5% to 13.0% .

Key words: Nitrobenzene compounds; Ultrasound; Gel chromatography; GC/MS; Biology

硝基苯类化合物作为重要的化工原料或中间体, 广泛应用于农药、医药、炸药、染料、造纸、纺织等领域。洪泽湖主要入湖河流淮河产生的硝基苯类有机污染物^[1], 以及湖区周边小型化工厂等由于处理不当等原因发生的硝基苯类化合物污染水体及底泥^[2]的事件, 都说明硝基苯类化合物对环境产生了巨大危害。

目前, 对硝基苯类化合物的研究主要是在水和废水方面, 对于生物体内的硝基苯类化合物研究还比较少。传统样品前处理方法主要有索氏提取法^[3]、水蒸汽蒸馏提取法^[4], 超声波法^[5-6]用于提取生物体中硝基苯类化合物的方法尚未见报道。索氏提取法准确可靠, 但操作费时, 溶剂使用量大, 不适用于大量样品的常规分析; 水蒸汽提取法的处理过程复杂, 中间环节多, 不能稳定控制提取效率。

今使用超声波法提取生物样品中的硝基苯类化合物, 凝胶色谱(GPC)净化、浓缩, 气相色谱/质谱联用(GC/MS)测定。该方法简便可行, 回收率稳定, 重现性好, 是比较理想的测定生物样品中硝基苯类化合物的方法。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 6890N - 5973 型气质联用仪, 配 G1701B. 02. 05 工作站, HP - 5MS 柱 ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.32 \mu\text{m}$), 美国安捷伦科技有限公司;

收稿日期: 2013-01-23; 修订日期: 2013-07-29

基金项目: 2011年江苏省环境监测科研基金资助项目(1111)

作者简介: 张莉(1981—), 女, 江苏淮安人, 工程师, 硕士, 从事有机污染物分析工作。

J2 凝胶色谱净化及在线浓缩系统, 美国 J2 Scientific 公司; FS-2 型可调高速匀浆机, 金坛科析仪器有限公司; 超声波处理器, 上海生析超声仪器有限公司。

2.0 g/L 的混合标准溶液(硝基苯、邻硝基氯苯、对硝基氯苯、间硝基氯苯、邻二硝基苯、间二硝基苯、对二硝基苯、2,4-二硝基甲苯、2,4-二硝基氯苯、2,4,6-三硝基甲苯等 10 种硝基苯类化合物溶于甲醇), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; 2.0 g/L 的硝基苯 - D₅ 标准品, 美国 Accustandard 公司; 无水硫酸钠(分析纯), 400 °C 下烘焙; 乙酸乙酯、环己烷、二氯甲烷、正己烷 均为分析纯。

1.2 仪器条件

色谱条件: 进样口温度为 270 °C, 不分流进样。初始温度 40 °C, 以 15 °C/min 的速度升至 250 °C 并保持 3 min, 再以 10 °C/min 的速度升至 280 °C 并保持 6 min。载气为高纯氦气, 恒定流量为 1.0 mL/min。

质谱条件: 接口温度 280 °C, EI 离子源, 电子能量 70 eV, 离子源温度 230 °C, 四极杆温度 150 °C, 溶剂延迟 6.5 min。

1.3 GPC 净化与浓缩

选用 C0785 型玻璃快速净化柱, 填料为 Bio-Beads S-X3 200 目 ~ 400 目。净化方法: 流动相为环己烷 - 乙酸乙酯(体积比为 1:1) 混合溶液, 流量为 4.7 mL/min, 进样体积为 5.0 mL。前 10 min 不收集, 后 8 min 收集。

浓缩方法: 选用液位传感模式下的溶液置换方法, 2.5 mL 正己烷为预加液, 自下而上 3 个工作区的温度及真空度分别为 40 °C、33.3 kPa, 48 °C、24.0 kPa, 50 °C、24.0 kPa, 用正己烷定容到 2 mL。

1.4 样品前处理

1.4.1 超声波法

称取 5 g 左右生物样品, 加入 5 g 无水硫酸钠研磨至无结块, 加入 20 mL 正己烷, 用匀浆机匀浆后超声(功率 450 W, 频率 20 kHz), 选择 1 s 脉冲模式, 提取 10 min, 经 4 000 rpm 离心 5 min, 收集有机相。重复 1 次上述步骤, 合并有机相, 氮吹浓缩至 10 mL。通过 GPC 净化提取液, 并收集 10 min ~ 18 min 的淋洗液。淋洗液经 GPC 浓缩, 残留物用正己烷定容到 2 mL 待测。

1.4.2 索氏提取法

称取 5 g 左右生物样品, 加入 5 g 无水硫酸钠研磨至无结块, 以 240 mL 正己烷 - 丙酮(体积比为 5:1) 混合溶液作萃取剂在索氏提取器中浸提。保持水浴温度 65 °C, 回流 18 h 后将提取液旋转蒸发, 转移时用正己烷荡洗, 蒸发后的残液经氮吹浓缩至 10 mL。经 GPC 净化、浓缩, 残留物用正己烷定容到 2 mL 待测。

1.5 测定

定性分析: 全扫描方式, 扫描范围为 45 u ~ 450 u, 扫描速度为 0.5 s/scan。

定量分析: 采用提取离子积分定量, 内标及各硝基苯类化合物的定量和辅助参考离子质荷比(m/z) 见表 1。

表 1 各硝基苯类化合物的质荷比(m/z)
Table 1 The nitrobenzene compounds for the mass to charge ratio(m/z)

| 化合物 | 定量离子 | 参考离子 |
|---------------------------|--------|--------|
| 硝基苯 - D ₅ (内标) | 82 | 128 54 |
| 硝基苯 | 77 | 123 51 |
| 间、对、邻硝基氯苯 | 111 | 157 75 |
| 对、间、邻二硝基苯 | 168 75 | 50 |
| 2,4-二硝基甲苯 | 165 | 89 |
| 2,4-二硝基氯苯 | 202 | 75 110 |
| 2,4,6-三硝基甲苯 | 210 | 89 63 |

2 结果与讨论

2.1 GPC 净化效率试验

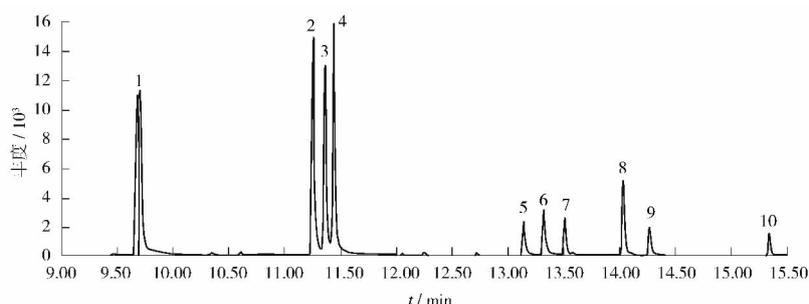
取 5 mg/L 的混合标准溶液 100 μL 定容到 10 mL 容量瓶中, 用按 1.5 方法定量。再配制同样浓度、体积的标准溶液用 GPC 净化, 进样体积为 5 mL, 浓缩至 2 mL 后用质谱定量, 结果见表 2。由表 2 可知, GPC 对硝基苯类化合物的净化效率为 78.3% ~ 93.4%。

2.2 标准曲线和检出限

取混合标准溶液用二氯甲烷配制成 100 mg/L 的使用液。于 6 个 2 mL 容量瓶中分别加入 0 μL、5.0 μL、20 μL、50 μL、100 μL、200 μL 使用液, 再分别加入 1 μL 内标液(2.0 g/L 的硝基苯 - D₅), 用正己烷定容到 2 mL, 得到 0 mg/L、0.25 mg/L、1.0 mg/L、2.5 mg/L、5.0 mg/L、10 mg/L 的标准系列溶液, 内标浓度为 1.0 mg/L。其中标准溶液(1.0 mg/L) 总离子流见图 1。

表 2 GPC 净化效率
Table 2 GPC removal efficiency

| 化合物 | 标准溶液质量浓度 $\rho / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ | 净化前的质量 $m / \mu\text{g}$ | 净化后的质量 $m / \mu\text{g}$ | 净化效率 / % |
|-------------|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
| 硝基苯 | 0.048 2 | 0.241 | 0.200 | 83.0 |
| 间硝基氯苯 | 0.060 4 | 0.302 | 0.251 | 83.1 |
| 对硝基氯苯 | 0.061 3 | 0.307 | 0.259 | 84.4 |
| 邻硝基氯苯 | 0.061 6 | 0.308 | 0.253 | 82.1 |
| 对二硝基苯 | 0.071 6 | 0.358 | 0.315 | 88.0 |
| 间二硝基苯 | 0.084 8 | 0.424 | 0.396 | 93.4 |
| 邻二硝基苯 | 0.079 5 | 0.397 | 0.311 | 78.3 |
| 2,4-二硝基甲苯 | 0.089 1 | 0.446 | 0.374 | 83.9 |
| 2,4-二硝基氯苯 | 0.083 6 | 0.418 | 0.349 | 83.5 |
| 2,4,6-三硝基甲苯 | 0.095 5 | 0.477 | 0.400 | 83.9 |



1—硝基苯- D_5 和硝基苯(9.68 min); 2—间硝基氯苯(11.26 min); 3—对硝基氯苯(11.36 min); 4—邻硝基氯苯(11.44 min); 5—对二硝基苯(13.14 min); 6—间二硝基苯(13.32 min); 7—邻二硝基苯(13.51 min); 8—2,4-二硝基甲苯(14.03 min); 9—2,4-二硝基氯苯(14.27 min); 10—2,4,6-三硝基甲苯(15.34 min)。

图 1 标准溶液(1.0 mg/L)总离子流

Fig. 1 Standard solution (1.0 mg/L) of total ion current

由图 1 可见,当硝基苯类化合物与内标液浓度接近时,保留时间 9.68 min 处出现分岔。硝基苯- D_5 和硝基苯在本色谱条件下分离度较差,但经过提取离子,硝基苯- D_5 的定量离子为 82,而硝基苯的定量离子为 77,两者积分不干扰,所以用硝基苯- D_5 做内标并不影响定量。

以目标物响应值与内标响应值之比为纵坐标,目标物质量浓度与内标物质量浓度之比为横坐标绘制校准曲线,结果见表 3。由于内标物质量浓度为 1.0 mg/L,经标准曲线回归后的 x 值就是样品的测定浓度。

连续分析 7 个接近于检出限浓度的实验室空白加标样品,计算其标准偏差 s 。根据公式: $MDL = s \times t_{(n-1, 0.99)}$ 计算检出限^[7] (其中: n ——样品的平行测定次数, t ——自由度为 $n-1$,置信度为 99% 时的 t 分布)。要求加标样品测定平均值与 MDL 比值在 3~5 之间的化合物数目要大于 50%,小于 1 和大于 10 的化合物数目要小于 10%,这对

于测定 MDL 的初次加标样品浓度比较合适。对于初次加标样品测定平均值与 MDL 比值不在 3~5 之间的化合物,要增加或减少浓度,重新进行平行分析,直至比值在 3~5 之间。选择比值在 3~5 之间的 MDL 作为该化合物的 MDL,结果见表 3。

2.3 精密度和准确度

按照 1.4 所述,分别对 2 份 5 g 鱼肉样品进行超声预处理和索氏提取, GPC 净化、浓缩,在相同试验条件下,进行鱼肉中的硝基苯类化合物的加标试验,重复测定 3 次,结果见表 4。由表 4 可见,超声波提取法的平均加标回收率为 76.5%~109%,索氏提取法的平均加标回收率为 72.3%~93.1%。索氏提取的过程中使用大量溶剂,必须通过旋转蒸发的方法去除溶剂,中间过程的增加,造成部分化合物的回收率有所降低。故超声波法更适宜水中生物体内硝基苯类化合物的富集、提取,重复测定 3 次的 RSD 为 1.5%~13.0%,精密度、准确度良好。

表3 硝基苯类化合物的校准曲线和检出限

Table 3 The standard curve of nitrobenzene compounds and detection limit

| 化合物 | 回归方程 | 相关系数 r | 检出限 $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$ |
|-------------|----------------------|----------|--|
| 硝基苯 | $y = 1.05x - 0.011$ | 1.00 | 0.010 |
| 间硝基氯苯 | $y = 0.757x - 0.002$ | 0.997 | 0.008 |
| 对硝基氯苯 | $y = 0.543x - 0.114$ | 0.998 | 0.008 |
| 邻硝基氯苯 | $y = 0.501x - 0.045$ | 0.999 | 0.008 |
| 对二硝基苯 | $y = 0.386x - 0.233$ | 0.996 | 0.025 |
| 间二硝基苯 | $y = 0.555x - 0.383$ | 0.998 | 0.025 |
| 邻二硝基苯 | $y = 0.400x - 0.207$ | 0.998 | 0.025 |
| 2,4-二硝基甲苯 | $y = 1.06x - 0.483$ | 0.995 | 0.020 |
| 2,4-二硝基氯苯 | $y = 0.341x - 0.172$ | 0.995 | 0.025 |
| 2,4,6-三硝基甲苯 | $y = 0.342x - 0.239$ | 0.995 | 0.030 |

表4 鱼肉样品的加标回收率($n=3$)Table 4 The recovery rate of fish samples($n=3$)

| 化合物 | 加标质量 $m/\mu\text{g}$ | 超声法回收率/% | RSD/% | 索氏提取法回收率/% |
|-------------|----------------------|----------|-------|------------|
| 硝基苯 | 1 | 80.8 | 6.1 | 82.3 |
| 间硝基氯苯 | 1 | 88.2 | 8.3 | 88.7 |
| 对硝基氯苯 | 1 | 80.4 | 3.2 | 86.2 |
| 邻硝基氯苯 | 1 | 87.5 | 8.7 | 88.6 |
| 对二硝基苯 | 3 | 90.0 | 2.5 | 93.1 |
| 间二硝基苯 | 3 | 76.5 | 13.0 | 74.2 |
| 邻二硝基苯 | 3 | 93.0 | 1.5 | 77.9 |
| 2,4-二硝基甲苯 | 2 | 80.4 | 11.3 | 72.3 |
| 2,4-二硝基氯苯 | 3 | 97.0 | 2.8 | 88.2 |
| 2,4,6-三硝基甲苯 | 3 | 109 | 5.7 | 83.8 |

2.4 实际样品测定

用上述方法对洪泽湖中具有代表性的生物样品泥鳅、河蚌、鲫鱼、白鱼、螺蛳、龙虾进行硝基苯类化合物的测定,结果见表5。由表5可见,除了鲫鱼肉中未检出,其他水生动物均有检出。其中,螺蛳中硝基苯类化合物测定值最高,为3 819 ng/g,河蚌、龙虾、泥鳅、白鱼肉中硝基苯类化合物的含量依次递减。结果表明,底栖动物中的硝基苯类化合物含量较高,而肉食性鱼又较杂食性鱼体内的含量高。硝基苯类化合物的生物累积现象已有所表现,这与淮河水体的污染以及洪泽湖自身的污染不无关系。

表5 生物样品中硝基苯类化合物的测定 ng/g

Table 5 Determination of nitrobenzene compounds

| 化合物 | in biological samples ng/g | | | | | |
|-------------|----------------------------|------|------|------|----|-------|
| | 白鱼 | 泥鳅 | 龙虾 | 河蚌 | 鲫鱼 | 螺蛳 |
| 硝基苯 | 37.4 | 239 | — | — | — | 752 |
| 间硝基氯苯 | — | 27.8 | 113 | — | — | 2 330 |
| 对硝基氯苯 | — | 38.0 | 160 | — | — | 67.1 |
| 邻硝基氯苯 | — | 52.3 | 220 | 55.1 | — | — |
| 对二硝基苯 | — | 29.8 | 129 | — | — | — |
| 间二硝基苯 | — | 26.0 | — | — | — | 156 |
| 邻二硝基苯 | — | 28.7 | 122 | — | — | 64.0 |
| 2,4-二硝基甲苯 | — | 27.7 | 116 | 364 | — | 148 |
| 2,4-二硝基氯苯 | — | 38.8 | — | 467 | — | 250 |
| 2,4,6-三硝基甲苯 | — | — | 44.8 | 111 | — | 52.4 |
| 硝基苯类化合物 | 37.4 | 508 | 905 | 997 | — | 3 819 |

3 结语

采用超声波法提取水中生物体内的硝基苯类化合物,经凝胶色谱净化、浓缩,气相色谱/质谱联用测定,与传统索氏提取法相比,超声波提取法效率更高更稳,凝胶色谱的净化效率为78.3%~93.4%。该法精密度、准确度良好,方法检出限低,适合水中生物体内硝基苯类化合物的检测,也便于批量样品的常规测定。

[参考文献]

- [1] 王子健,吕怡兵,王毅,等. 淮河水体取代苯类污染及其生态风险[J]. 环境科学学报, 2002, 22(3): 300-304.
- [2] 王芳,陆梅,梁卫清. 固相萃取-气相色谱法测定地表水和底泥中硝基苯类化合物[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(6): 50-52.
- [3] 郎佩珍,王敏健,龙凤山,等. 鱼和蚌体中多种有机污染物的提取和净化方法[J]. 中国环境监测, 1986, 2(3): 6-10.
- [4] NISHIKAWA Y, OKUMURA T. Determination of nitrobenzenes in river water, sediment and fish samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 312(118): 45-55.
- [5] 李冰清. 超声波提取土壤中的半挥发性有机物[J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21(6): 65-67.
- [6] 刘薇,刘侨博. 环境样品中硝基苯类化合物测定的预处理方法概述[J]. 环境科学与管理, 2008, 33(9): 124-126.
- [7] 环境保护部. HJ 168-2010 环境监测 分析方法标准制订技术导则[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010.