液相色谱-质谱法分析黑碳的分子标志物—— 苯多羧酸和硝基苯多羧酸

黄国培^{1,3}, 陈颖军^{1,2*}, 田崇国¹, 刘 莹¹

(1. 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东省海岸带环境过程重点实验室,
中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003;

2. 同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 苯多羧酸法是定量检测黑碳和溶解态黑碳的重要分子标志物法, 其中苯多羧酸和硝基苯多羧酸的分离和定量是关键环节。本文建立了苯多羧酸和硝基苯多羧酸的液相色谱-质谱分析方法, 利用质谱的定性能力解决了部分苯多羧酸和硝基苯多羧酸化合物在缺乏标准品情况下的定性问题。用 Phenomenex Synergi Polar RP 分离柱, 柱温为 35 ℃, 流动相为 0.5% (体积分数) 甲酸水溶液和甲醇, 流速为 0.5 mL/min, 梯度洗脱, 以电喷雾离子源负离子全扫描和选择扫描模式进行离子阱质谱检测, 同时利用串联的二极管阵列检测器采集三维紫外光谱数据。在实际样品检测中, 14 个含 3 个及以上羧基的苯多羧酸和硝基苯多羧酸化合物获得良好分离。此方法简化并加快了苯多羧酸法定量黑碳和溶解态黑碳的分析过程, 可满足环境样品中黑碳和溶解态黑碳的分析, 促进了苯多羧酸法应用的普及。

关键词 液相色谱-质谱; 苯多羧酸; 硝基苯多羧酸; 黑碳; 溶解态黑碳

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713 (2016) 03-0306-08

Analysis of benzene polycarboxylic acids and nitro- benzene polycarboxylic acids as molecular tracers of black carbon by using liquid chromatography-mass spectrometry

HUANG Guopei^{1,3}, CHEN Yingjun^{1,2*}, TIAN Chongguo¹, LIU Ying¹

(1. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, Chinese Academy
of Sciences; Shandong Provincial Key Laboratory of Coastal Environmental Processes;

Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;

2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract : The benzene polycarboxylic acid (BPCA) method is an important molecular marker method for black carbon and dissolved black carbon quantification while the separation and quantification of benzene polycarboxylic acids and nitro-benzene polycarboxylic acids are the key process. In order to use mass spectrometer to solve the issue of identification of benzene polycarboxylic acids and nitro-benzene polycarboxylic acids due to the lack of the standards of some of the target compounds, a liquid chromatography-mass spectrometry method was proposed. It made the experimental procedures easier and faster than using the gas chromatography-mass spectrometry, and would promote the use of the BPCA method. A Phenomenex Synergi Polar RP column was used. The digestion productions of black carbon and dissolved black carbon were gradiently eluted by the mobile phases of 0.5% (v/v) aqueous formic acid solution

收稿日期: 2015-10-29

* 通讯联系人, E-mail: yjchentj@tongji.edu.cn.

基金项目: 2011 年度中国科学院研究生科技创新与社会实践专项基金。

Foundation item : Technology Innovation and Social Practice Program of University of Chinese Academy of Sciences for Graduate Students in 2011.

and methanol with the flow rate of 0.5 mL/min at 35 °C. The determination was conducted by an ion trap mass spectrometer in negative electrospray ionization (ESI) mode under full scan and selected ion monitoring (SIM) modes. Simultaneously the three-dimensional ultraviolet spectra were collected by a photo diode array detector. The LC-MS method was proved to be suitable for the analysis of environmental black carbon and dissolved black carbon.

Key words : liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); benzene polycarboxylic acids; nitro-benzene polycarboxylic acids; black carbon; dissolved black carbon

黑碳 (black carbon, BC) 广泛存在于大气、水、土壤、沉积物、高山和极地冰川中, 影响全球碳循环和气候变化, 在环境、生态和人类健康等方面有诸多副作用^[1-3]。我国黑碳排放量约占世界黑碳总排放量的四分之一^[4], 产生了严重的负效应, 成为当前研究的热点^[5]。黑碳的定量方法研究仍是当前研究的重要领域。不同环境介质中黑碳的组成、形态和基质不同, 其定量方法也不同^[1, 6]。黑碳的定量至今没有统一的标准, 海婷婷等^[6]综述了不同环境介质中黑碳的定量方法及各自的优缺点, 其中苯多羧酸法 (benzene polycarboxylic acids, BPCA) 是定量黑碳的分子标志物法, 在定量的同时能提供黑碳的分子结构信息^[7]。溶解态黑碳 (dissolved black carbon, DBC) 是一种特殊形态的黑碳^[8, 9], 通常适用于颗粒状黑碳的定量方法并不适用于溶解态黑碳^[10], 而 BPCA 法是一种适用于所有环境介质中所有形态黑碳的定量方法^[3, 7, 10]。

BPCA 法的原理为黑碳和溶解态黑碳的稠环结构在浓硝酸高温高压消解下断裂生成仅含一个苯环的化合物, 原来相连苯环的碳-碳 π 键被断开氧化成羧基, 这些化合物是苯多羧酸和硝基苯多羧酸。羧基的位置和数量反映原来黑碳和溶解态黑碳结构中相连苯环的位置和数量^[7]。与黑碳和溶解态黑碳共存的有机物绝大部分被彻底氧化成 CO_2 , 部分难消解的有机物 (如腐殖质、干酪根) 虽不能被完全氧化成 CO_2 , 但其产物所含羧基数目小于等于 2^[7, 11, 12]。实验^[7, 11, 13]证明一般环境样品 (应先排除石墨、石墨烯和煤的污染) 中含 3 个及以上羧基的苯多羧酸和硝基苯多羧酸专属来源于黑碳和溶解态黑碳。通常采用色谱法对苯多羧酸和硝基苯多羧酸进行定量, 然后根据经验公式把苯多羧酸和硝基苯多羧酸的量换算成原样品中黑碳和溶解态黑碳的含量^[7, 10, 12]。BPCA 法最早由 Glaser 等^[7]提出, 后经 Brodowski 等^[13]改进。Glaser 等^[7]、Brodowski 等^[13]及后续研究者^[11, 12]采用气相色谱法分析苯多羧酸和硝基苯多羧酸。气相色谱法分析前需衍生化 (硅烷化或甲基化)^[7, 12, 13], 但由于样品基质和实验

使用的试剂 (如浓硝酸) 不可避免地带有金属离子, 而微量存在的金属离子即可显著影响衍生化效率, 因此需要用阳离子交换树脂去除金属离子^[7, 13]。经阳离子树脂净化后, 样品含有大体积的水 (50 mL), 需采用冷冻干燥法去除水^[7, 13]。此外, 样品含有酸 (盐酸和硝酸), 在冷冻干燥过程中会腐蚀仪器, 且冻干至少需要 48 h。由此可见, 树脂净化、冷冻干燥和衍生化这 3 个步骤繁锁、耗时, 且容易导致结果的准确性和重复性下降^[14, 15]。

液相色谱法分析苯多羧酸和硝基苯多羧酸则不需要树脂净化、冷冻干燥和衍生化步骤, 使实验简化, 并大大缩短实验时间^[10, 15]。Dittmar^[10]建立了液相色谱分析苯多羧酸的方法, 但由于苯多羧酸属于极性化合物, 需加入离子对试剂 (四丁基溴化铵) 才能在 C_{18} 柱上分离^[10, 16]。由于部分目标化合物没有商品化标准品, 且添加离子对试剂的流动相不能使用质谱进行检测, 导致此方法只能采用液相色谱定量有标准品的苯多羧酸, 无法定量缺失标准品的硝基苯多羧酸^[10], 但硝基苯多羧酸占黑碳消解产物的比例高达 24%~53%, 不能忽略^[12]。质谱是定性化合物的有力工具, 若建立适用于质谱的液相色谱条件, 则可以利用液相色谱-质谱定性检测出缺失标准品的化合物, 从而利用液相色谱定量苯多羧酸和硝基苯多羧酸。为实现此目的, 本文对分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸的液相色谱-质谱条件进行了探索, 最终找到了适宜条件。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters Alliance E2695 高效液相色谱仪配备 2998 型二极管阵列 (photo-diode array, PDA) 检测器、Waters Acquity UPLC H-Class 超高效液相色谱仪配备 ACQUITY UPLC PDA 检测器 (美国 Waters 公司), Thermo Scientific LCQ Fleet 离子阱液相色谱-质谱联用仪配备 PDA 检测器 (美国 Thermo Scientific 公司)。Waters Sunfire C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ; 150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm)、

Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Waters Acquity UPLC HSS T3 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) (美国 Waters 公司), Thermo Hypersil Gold C_{18} 柱 (100 mm×2.2 mm, 1.9 μm)、Thermo Hypersil Gold aq 柱 (100 mm×2.2 mm, 1.9 μm)、Thermo Hypersil Gold PFP 柱 (100 mm×2.2 mm, 1.9 μm)、Thermo Hypercarb 柱 (100 mm×4.6 mm, 5 μm) (美国 Thermo Scientific 公司), Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) (美国 Agilent 公司), Phenomenex Synergi Polar RP 柱 (250 mm×4.6 mm, 4 μm ; 150 mm×2 mm, 2.5 μm) (美国 Phenomenex 公司)。SPE 柱 (Supelclean ENVI-Chrom P SPE Tube, 柱床质量 500 mg, 柱管体积 6 mL, 美国 Supelco 公司), 石英纤维膜 (美国 PALL 公司), 特氟龙消解罐 (2 mL, 成都奥普勒仪器有限公司)。

苯六甲酸 (纯度为 99%)、苯五甲酸 (纯度为 98%)、1,2,4,5-苯四甲酸 (纯度为 96%)、1,2,3-苯三甲酸 (纯度为 98%)、1,2,4-苯三甲酸 (纯度为 99%)、1,3,5-苯三甲酸 (纯度为 95%)、邻苯二甲酸 (纯度为 99.5%)、3-硝基邻苯二甲酸 (纯度为 98%) 标准品和内标 2'-联苯二甲酸 (纯度为 97%) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 5-硝基-1,2,3-苯三甲酸 (纯度为 97%) 标准品购于杭州伊联化工有限公司, 各标准品均为固体。另有 8 个目标化合物 (1,2,3,4-苯四甲酸、1,2,3,5-苯四甲酸、5-硝基-1,2,3,4-苯四甲酸、3-硝基-1,2,4,5-苯四甲酸、4-硝基-1,2,3-苯三甲酸、3-硝基-1,2,4-苯三甲酸、5-硝基-1,2,4-苯三甲酸和 6-硝基-1,2,4-苯三甲酸) 没有商品化标准品。活性炭 (100~400 目) 购于美国 Sigma-Aldrich 公司。乙腈、甲醇、甲酸 (色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司), 甲酸铵、磷酸、硝酸 (优级纯, 国药集团化学试剂有限公司), 超纯水 (美国 PALL 公司超纯水机净化)。其他试剂为国产分析纯。

用甲醇配制质量浓度为 2 g/L 的内标溶液和系列质量浓度为 1、2、5、10、20、50 和 100 mg/L 的混合标准溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

海水和河水样品 (含 DBC) 的处理: 用 450 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧过的石英滤膜过滤水样, 取滤后水样 2 L, 浓盐酸调节 pH 值至 2, 过 SPE 柱。用超纯水洗净 SPE 柱上的盐分, 用 10 mL 甲醇洗脱出 DBC。将 DBC 甲醇溶液转移到 2 mL 的特氟龙消解罐中, 氮气吹干, 加入 0.5 mL 浓硝酸, 密封消解罐, 放入烘箱中加热

到 170 $^{\circ}\text{C}$, 消解 7 h。消解完成后, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干消解液以除去硝酸和水, 加入 5 μL 内标溶液。用 1 mL 甲醇重溶样品, 转移到进样瓶中等待上机分析^[7,10,13]。

黑碳模拟物样品的处理: 称取 3.00 mg 活性炭, 放入特氟龙消解罐中, 加入 0.5 mL 浓硝酸, 密封消解罐, 放入烘箱中加热到 170 $^{\circ}\text{C}$, 消解 7 h。消解完后在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干消解液以除去硝酸和水, 加入 5 μL 内标溶液。用 1 mL 甲醇重溶样品, 针筒滤膜 (0.2 μm) 过滤后转移到进样瓶中等待上机分析^[7,10,13]。

1.2.2 仪器分析

利用标准品和兼容质谱的流动相 (流动相中的添加剂仅限挥发性的酸、碱或盐), 在 HPLC 和 UPLC 仪器上尝试不同类型的色谱柱, 改变流动相、洗脱梯度、流速和柱温, 直到找到分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸的合适条件, 然后把该方法应用到配备 PDA 的 HPLC-MS 系统上, 定性识别出所有苯多羧酸和硝基苯多羧酸化合物, 获得各目标化合物的保留时间和三维紫外光谱图。

分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸的 HPLC-PDA 方法以 Phenomenex Synergi Polar RP 柱 (250 mm×4.6 mm, 4 μm) 作色谱柱, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 10 μL , 流动相 A: 0.5% (体积分数, 下同) 甲酸水溶液 (pH 2.3); 流动相 B: 甲醇; 流速: 0.5 mL/min (在 60~85 min 清洗色谱柱阶段, 流速为 1 mL/min)。流动相线性梯度程序: 初始流动相为 95% 的流动相 A、5% 的流动相 B, 保持 10 min; 流动相 B 在 45 min 时升至 40%, 55 min 时升至 85%, 60 min 时升至 90% 并保持到 70 min, 75 min 时降至 5% 并保持到 90 min。检测器: PDA, 检测波长 240 nm。

分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸的 UPLC-PDA 方法以 Phenomenex Synergi Polar RP 柱 (150 mm×2 mm, 2.5 μm) 作色谱柱, 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 1 μL , 流动相 A: pH 2.1 的磷酸水溶液; 流动相 B: 甲醇; 流速: 0.2 mL/min。流动相线性梯度程序: 初始流动相为 100% 的流动相 A, 保持 4 min; 流动相 B 在 10 min 时升至 12% 并保持到 16 min, 28 min 时升至 60%, 30 min 时升至 85%, 35 min 时升至 90%, 40 min 时降至 0 并保持到 45 min。检测器: PDA; 检测波长 240 nm。

质谱条件: 电喷雾离子 (ESI) 源负离子模式, 全扫描和选择离子扫描 (SIM) 模式。离子源参数: 鞘气流速为 30 arbitrary units, 辅助气流速为 10 arbitrary units, 吹扫气流速为 0, 喷雾电压为 -5 kV, 毛

细管传输线温度为 300 ℃。质谱用标准品(单标)调谐使目标化合物拥有最佳响应。PDA 检测器参数 扫描波长为 210~400 nm,提取波长为 240 nm。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

苯多羧酸和硝基苯多羧酸为多元弱酸,存在多级电离,在中性和碱性条件下以离子形式存在,此时它们在反相色谱柱上保留很弱甚至没有保留。酸性条件抑制电离,使它们更多地以分子形式存在,增强其在反相色谱柱上的保留能力。适用于液相色谱-质谱联用仪的酸有乙酸、甲酸和三氟乙酸(pK_a 值分别为 4.74、3.74 和 0.23),其中三氟乙酸酸性最强,但会导致负离子离子化效率严重降低,因此三氟乙酸在负离子模式下的液相色谱-质谱中极少使用。对于酸性化合物,调节流动相的 pH 值到目标化合物的一级 pK_a 值可使 50% 的目标化合物为分子状态。苯多羧酸各化合物的一级 pK_a 值均小于 3,其中苯六甲酸和苯五甲酸的一级 pK_a 值分别为 0.68 和 1.8^[16,17],因此需选用酸性较强的甲酸来调节流动相得到较低的 pH 值,并对甲酸水溶液/乙腈或甲酸水溶液/甲醇进行梯度洗脱条件探索。

2.2 色谱柱的选择

酸性条件下苯三甲酸和苯四甲酸容易分离且已有文献^[18]报道,苯五甲酸和苯六甲酸的分离未见报道,也是本研究的难点,因此本文着重就苯五甲酸和苯六甲酸的分离条件进行研究。

试验发现影响苯五甲酸和苯六甲酸分离的最关键因素是色谱柱的固定相,因此筛选合适固定相的色谱柱成为工作的重点。根据甲酸水溶液的酸性范围和色谱柱的 pH 耐受能力,配制不同浓度的甲酸水溶液(0.1%~5%,体积分数,下同)或甲酸(0.1%~5%)—甲酸铵(1~50 mmol/L)水溶液,以 95%~100% 的水相为初始条件,考察了不同类型色谱柱对苯五甲酸和苯六甲酸的保留能力和分离能力。

非极性封端 C_{18} 柱(Waters Sunfire C_{18} 柱、Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱和 Thermo Hypersil Gold C_{18} 柱)是最常用的反相色谱柱,主要利用疏水作用进行分离,极性越大疏水性越小的化合物保留能力越弱。苯五甲酸和苯六甲酸在普通 C_{18} 柱上几乎没有任何保留,无法实现分离。

Waters Acquity UPLC HSS T3 柱和 Thermo Hypersil Gold aq 柱采用专利封端技术,是专门设计以加强极性化合物的保留能力且耐受 100% 水相的色谱柱,但苯五甲酸和苯六甲酸在此两款柱上的保

留能力仍有限,无法实现分离。

五氟苯基柱(Thermo Hypersil Gold PFP 柱)在固定相上接入氟原子,有偶极-偶极相互作用,比烷基固定相有更强的离子交换和极性作用,专门用于卤化物和含羟基、羧基、硝基等极性化合物的分离。理论上五氟苯基柱对富含羧基和硝基的苯多羧酸和硝基苯多羧酸有很好的保留能力,但试验结果表明 Thermo Hypersil Gold PFP 柱不能分离苯五甲酸和苯六甲酸。

多孔渗水石墨(porous graphitic carbon, PGC)有一种独特的固定相结构,碳原子以平面六边形结构紧密结合,形成大分子的多环芳香族化合物,结构和保留机制(吸附和电荷诱导作用)与传统的硅胶键合相均不相同,对极性很强的化合物有很强的保留能力,而且化合物极性越强,其电荷诱导作用力越强^[19]。基于此理论,本文尝试用 PGC 柱(Thermo Hypercarb 柱)分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸。结果表明苯多羧酸和硝基苯多羧酸在 PGC 柱上保留很强,为利用竞争吸附作用提高洗脱能力,以甲醇添加甲酸(0.2%~2%)和甲酸铵(5 mmol/L)进行洗脱,也难以将其洗脱下来,其中苯五甲酸和苯六甲酸甚至不出峰。

Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱是一款采用专利键合技术保护固定相而未封端的 C_{18} 柱,由于未被封端的硅羟基作用,苯五甲酸和苯六甲酸在 Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱上有较强的保留能力。当流动相中仅添加甲酸时,峰形出现分叉和拖尾,添加甲酸铵后峰形得到改善。本试验据此优化了利用 Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸的 HPLC-MS 条件:用 1.8% 甲酸-5 mmol/L 甲酸铵水溶液和乙腈进行梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min,柱温为 40 ℃。此条件美中不足的是初始流动相必须为 100% 水相。但 Agilent Zorbax SB- C_{18} 柱并不耐受 100% 水相,若强行使用,则色谱柱极易发生疏水塌陷,大大缩短其使用寿命。此外,由于水相中添加了甲酸铵和采用梯度洗脱,导致 PDA 色谱图的基线变化很大。基于这两个原因,非常有必要继续寻找更合适的色谱柱。

Phenomenex Synergi Polar RP 柱是针对极性和芳香结构化合物的分离而设计的,在硅胶基上键合丙醚-苯结构,对硅羟基进行专利的极性封端,以期产生对极性化合物的最大保留能力。试验结果表明 Phenomenex Synergi Polar RP 柱对苯五甲酸和苯六甲酸有足够的保留能力和分离能力。因此本文建立了利用 Phenomenex Synergi Polar RP 柱(250

mm×4.6 mm, 4 μm)分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸的液相色谱-质谱方法。用 60 min 分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸,用 30 min 对色谱柱进行冲洗和再

平衡,具体条件见 1.2.2 节。对试验过程中所使用的各类型色谱柱、型号及分离效果进行了归纳(见表 1)。

表 1 不同色谱柱对苯五甲酸和苯六甲酸的分离效果

Table 1 Separation results of benzene pentacarboxylic acid and benzene hexacarboxylic acid with different columns

Column type	Company and brand	Separation result
Non-polar end capped C ₁₈ column	Waters Sunfire C ₁₈	nearly no retention, not enough separated
	Waters Acquity UPLC BEH C ₁₈	
	Thermo Hypersil Gold C ₁₈	
C ₁₈ column stable in 100% aqueous phase	Waters Acquity UPLC HSS T3	weak retention, not enough separated
	Thermo Hypersil Gold aq	
Penta-fluoro phenyl column	Thermo Hypersil Gold PFP	weak retention, not enough separated
Porous graphitic carbon column	Thermo Hypercarb	too strong retention, hard to be eluted
Non-encapped C ₁₈ column	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	not very well separated with 100% aqueous phase: 1.8% formic acid-5 mmol/L ammonium formate water solution
Ether-linked phenyl phase with proprietary hydrophilic endcapping	Phenomenex Synergi Polar RP	well separated with 95% aqueous phase: 0.5% formic acid water solution

2.3 化合物的分离结果和定性分析

图 1 为分离苯多羧酸和硝基苯多羧酸标准品的 HPLC-PDA 和 HPLC-MS 谱图,可以看到各标准品均得到基线分离且峰形对称、无拖尾。图 2 为实际样品(河水、海水和活性炭样品)的分离结果。BPCA法分析过程中的高温高压消解这一步骤可以

清除样品中绝大部分干扰物,有利于色谱分析。从图 2 中可以看到实际样品的色谱图基线平稳,22 个化合物中有 14 个为含 3 个及以上羧基的苯多羧酸和硝基苯多羧酸目标化合物,均获得良好分离,说明分离条件满足分析要求。此外,硝基苯四甲酸和硝基苯三甲酸的色谱峰非常明显,信号强度与苯四甲酸和苯三甲酸相当,从而再次证明硝基苯多羧酸占有重要的比例,不容忽视^[12]。此外,样品中还可见明显的硝基邻苯二甲酸和二硝基邻苯二甲酸的峰,但这些化合物并不专属来源于黑碳和溶解态黑碳,为排除干扰,BPCA法定量黑碳和溶解态黑碳时不考虑这些含 2 个羧基的化合物^[13]。

通过标准品和质谱定性识别的各苯多羧酸和硝基(二硝基)苯多羧酸化合物的保留时间和[M-H]⁻离子碎片见表 2。除苯五甲酸和苯六甲酸外,各苯多羧酸和硝基(二硝基)苯多羧酸化合物在电喷雾离子源中脱去 1 个 H,形成[M-H]⁻主峰。苯五甲酸和苯六甲酸除脱去 1 个 H 形成[M-H]⁻外,还极易脱去 1 个 H 和 1 个 H₂O,形成[M-H-H₂O]⁻^[20](见图 3)。

2.4 超高效液相色谱法

利用 HPLC-MS 分析苯多羧酸和硝基苯多羧酸时每个样品的时间长达 90 min,当需要分析大批量样品时,缩短单个样品的分析时间就显得十分重要,因此本文进一步建立了 UPLC 法以实现快速分离。

利用 Phenomenex Synergi Polar RP 柱(150 mm×2 mm, 2.5 μm),参考 HPLC-MS 条件,建立了 UPLC-PDA 方法。试验过程中发现 Phenomenex Synergi Polar RP 短柱的柱效低于相同类型固定相的高效液相色谱长柱,苯五甲酸和苯六甲酸不

图 1 苯多羧酸和硝基苯多羧酸标准品的 (a) HPLC-PDA (λ=240 nm) 和 (b) HPLC-MS 色谱图

Fig. 1 Chromatograms of benzene polycarboxylic acids and nitro-benzene polycarboxylic acids standards by (a) HPLC-PDA (λ=240 nm) and (b) HPLC-MS

For peak identifications, see Table 2.

图 2 实际样品的 HPLC-PDA 和 HPLC-MS-SIM 色谱图
Fig. 2 Chromatograms of samples by HPLC-PDA and HPLC-MS-SIM
For peak identifications , see Table 2.

能完全分离。增加流动相中的甲酸浓度可以稍微提高分离度,但由于受甲酸水溶液所能达到的 pH 值所限,把甲酸水溶液的浓度提高到大于 2% 仍无法实现完全分离。Phenomenex Synergi Polar RP 柱的 pH 值耐受范围为 pH 2~7,尝试改用磷酸($pK_{a1}=2.12$)调节流动相 A 的 pH 值到 2.1,实现了苯五甲酸和苯六甲酸的分离。最终以 100% 的水相为起始条件,以 pH 2.1 的磷酸水溶液和甲醇进行梯度洗脱,用 30 min 完成了苯多羧酸和硝基苯多羧酸的分离,然后再用 15 min 进行色谱柱的冲洗和再平衡(详见 1.2.2 节)。UPLC-PDA 法使样品的分析时间比 HPLC-MS 法缩短了一半。根据标准品、HPLC-MS 色谱峰的相对保留时间和三维紫外光谱对各化合物进行确认。图 4 为苯多羧酸和硝基苯多羧酸标

表 2 苯多羧酸和硝基(二硝基)苯多羧酸的保留时间和质谱选择扫描离子

Table 2 Retention times and selected monitoring (SIM) ions of benzene polycarboxylic acids and nitro (dinitro)-benzene polycarboxylic acids			
No.	Retention time/min	[M-H] ⁻	Compound
1	5.0	341	benzene-1,2,3,4,5,6-hexacarboxylic acid* ^T
2	6.0	298	3-nitrobenzene-1,2,4,5-tetracarboxylic acid ^T
3	6.9	297	benzene-1,2,3,4,5-pentacarboxylic acid* ^T
4	8.4	298	5-nitrobenzene-1,2,3,4-tetracarboxylic acid ^T
5	9.3	299	dinitro-benzenetricarboxylic acid
6	11.4	254	nitro-benzenetricarboxylic acid No. 1 ^{#T}
7	11.6	253	benzene-1,2,4,5-tetracarboxylic acid* ^T
8	12.8	253	benzene-1,2,3,4-tetracarboxylic acid ^T
9	15.9	254	nitro-benzenetricarboxylic acid No. 2 ^{#T}
10	17.2	254	4-nitrobenzene-1,2,3-tricarboxylic acid ^T
11	21.2	253	benzene-1,2,3,5-tetracarboxylic acid ^T
12	23.1	254	nitro-benzenetricarboxylic acid No. 3 ^{#T}
13	28.7	209	benzene-1,2,4-tricarboxylic acid* ^T
14	30.0	209	benzene-1,2,3-tricarboxylic acid* ^T
15	31.9	255	dinitrophthalic acid No. 1 [#]
16	33.1	210	3-nitrophthalic acid*
17	36.7	165	phthalic acid*
18	38.8	255	dinitrophthalic acid No. 2 [#]
19	40.8	255	dinitrophthalic acid No. 3 [#]
20	41.7	254	5-nitrobenzene-1,2,3-tricarboxylic acid* ^T
21	42.5	209	benzene-1,3,5-tricarboxylic acid
22	44.7	210	4-nitrophthalic acid
23	57.9	241	biphenyl-2,2'-dicarboxylic acid

* Compounds have standards. # Compounds have isomers without confirmed structures. T : target compounds for black carbon and dissolved black quantification. [M-H]⁻ : the molecules lose one H and form fragment of [M-H]⁻ by negative electrospray ionization.

图 3 代表性苯多羧酸和硝基苯多羧酸化合物的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of representative compounds of benzene polycarboxylic acids and nitro-benzene polycarboxylic acids

准品的 UPLC-PDA 色谱图。UPLC-PDA 法和 HPLC-MS 法采用了相同固定相的色谱柱, 同样用酸性水溶液和甲醇进行梯度洗脱, 各目标化合物在 UPLC-PDA 法和 HPLC-MS 法上的出峰顺序一致。

2.5 仪器检出限、线性范围和重现性

通过逐级稀释测定的方法确定 HPLC-PDA 和 UPLC-PDA 分析苯多羧酸和硝基苯多羧酸的仪器检出限分别为 5 和 0.5 ng, 低于气相色谱法的仪器检出限 (Brodowski 等^[13]报道为 7 ng, Ziolkowski 等^[12]报道为 10 ng)。分析环境水样中溶解态黑碳时, 发现样品中目标化合物的质量浓度范围为 2~20 mg/L, 于是配制系列质量浓度为 1、2、5、10、20、50 和 100 mg/L 的标准品做工作曲线, 采用内标法进行定量, 内标化合物溶液质量浓度为 10 mg/L。提取 240 nm 波长的色谱图进行定量, 各标准品化合

图 4 苯多羧酸和硝基苯多羧酸标准品的 UPLC-PDA ($\lambda = 240$ nm) 色谱图Fig. 4 Chromatogram ($\lambda = 240$ nm) of benzene polycarboxylic acids and nitro-benzene polycarboxylic acids standards by UPLC-PDA

For peak identifications, see Table 2.

物的线性拟合度良好, $r > 0.99$ (见表 3)。没有标准品的化合物采用同系物的校正曲线进行半定量, 即 1,2,3,4-苯四甲酸、1,2,3,5-苯四甲酸、5-硝基-1,2,3,4-苯四甲酸和 3-硝基-1,2,4,5-苯四甲酸采用 1,2,4,5-苯四甲酸的校正曲线进行定量; 5 个硝基苯三甲酸采用 5-硝基-1,2,3-苯三甲酸的校正曲线进行定量。本实验室用 HPLC-PDA 方法和 UPLC-PDA 方法共分析了近千个溶解态黑碳样品^[21], 结果表明

HPLC 和 UPLC 系统十分稳定, 化合物的色谱峰重现性良好, 保留时间的飘移小于 1 min。在 300 个样品为一个批次的连续分析中, 质控标准品 (每 10 个样品插入一个质控标准品) 的偏差范围小于 5%。对 20 个水样中的溶解态黑碳进行重复分析, 结果显示 2 次检测结果的偏差范围为 0.1%~12.8%, 平均值为 $(4.6 \pm 3.6)\%$ 。良好的线性拟合度和重现性证明本方法能满足质量控制和质量保证要求。

表 3 苯多羧酸和硝基苯多羧酸各标准品化合物的校正曲线和回归系数
Table 3 Calibration curves and regression coefficients of benzene polycarboxylic acids and nitro-benzene polycarboxylic acids standards

Compound	Regression equation	r
Benzene-1,2,3,4,5,6-hexacarboxylic acid	$Y = 0.663X - 0.00979$	0.9999
Benzene-1,2,3,4,5-pentacarboxylic acid	$Y = 0.569X + 0.00307$	0.9990
Benzene-1,2,4,5-tetracarboxylic acid	$Y = 0.637X - 0.0982$	0.9995
Benzene-1,2,4-tricarboxylic acid	$Y = 0.896X + 0.115$	0.9992
Benzene-1,2,3-tricarboxylic acid	$Y = 0.471X + 0.0726$	0.9953
Phthalic acid	$Y = 0.800X + 0.00869$	0.9994
3-Nitrophthalic acid	$Y = 0.594X - 0.0556$	0.9999
5-Nitro-1,2,3-tricarboxylic acid	$Y = 0.672X - 0.0839$	0.9997
Benzene-1,2,3,5-tricarboxylic acid	$Y = 0.609X - 0.0685$	0.9998

Y : the ratio of target compound mass concentration to internal standard mass concentration; X : the ratio of target compound peak area to the internal standard peak area.

3 结论

本文建立了用于检测黑碳和溶解态黑碳消解产物苯多羧酸和硝基苯多羧酸的 HPLC-MS 法和 UPLC-PDA 法, 利用质谱的定性能力解决了部分苯多羧酸和硝基苯多羧酸化合物在缺乏标准品情况下的定性问题。本文的方法比气相色谱-质谱法更简单、快捷 (最快小于 45 min), 且方法检出限低于实际环境中的样品含量, 线性和重复性均良好, 使 BPCA 法在众多黑碳定量方法中优势更明显, 这必将促进 BPCA 法应用的普及。当商品化标准品缺失的问题得到解决时, BPCA 法或将成为黑碳定量标准方法的首选。

参考文献:

- [1] Masiello C A. Mar Chem, 2004, 92 (1/4): 201
- [2] Goldberg E D. Black Carbon in the Environment: Properties and Distribution. New York: Wiley, 1985
- [3] Ding Y, Yamashita Y, Jones J, et al. Biogeochem, 2015, 123 (1/2): 15
- [4] Qin Y, Xie S D. Atmos Environ, 2011, 45 (38): 6995
- [5] Andersson A, Deng J J, Du K, et al. Environ Sci Technol, 2015, 49 (4): 2038
- [6] Hai T T, Chen Y J, Wang Y, et al. Environmental Science & Technology, 2013, 36 (12): 153
海婷婷, 陈颖军, 王艳, 等. 环境科学与技术, 2013, 36 (12): 153
- [7] Glaser B, Haumaier L, Guggenberger G, et al. Org Geochem, 1998, 29 (4): 811
- [8] Kim S, Kaplan L A, Benner R, et al. Mar Chem, 2004, 92: 225
- [9] Huang G P, Chen Y J, Tian C G, et al. Advances in Earth Science, 2012, 27 (12): 1326
黄国培, 陈颖军, 田崇国, 等. 地球科学进展, 2012, 27 (12): 1326
- [10] Dittmar T. Org Geochem, 2008, 39 (4): 396
- [11] Ziolkowski L A, Druffel E R M. Mar Pollut Bull, 2009, 59: 213
- [12] Ziolkowski L A, Chamberlin A R, Greaves J, et al. Limnol Oceanogr Meth, 2011, 9 (4): 140
- [13] Brodowski S, Rodionov A, Haumaier L, et al. Org Geochem, 2005, 36 (9): 1299
- [14] Schneider M P W, Hilf M, Vogt U F, et al. Org Geochem, 2010, 41 (10): 1082
- [15] Schneider M P W, Smittenberg R H, Dittmar T, et al. Org Geochem, 2011, 42 (3): 275
- [16] Kawamura K, Okuwaki A, Verheyen T, et al. Sep Sci Technol, 2006, 41 (2): 379
- [17] Kvaratskheliya R, Kvaratskheliya E. Russ J Electrochem, 2006, 42 (9): 978
- [18] Yassine M M, Dabek-Zlotorzynska E. Anal Meth, 2010, 2 (2): 129
- [19] Yang L, He W, Liu J, et al. Research and Exploration in Laboratory, 2012, 31 (10): 238
杨柳, 贺伟, 刘娟, 等. 实验室研究与探索, 2012, 31 (10): 238
- [20] Frauendorf H, Herzsuh R. Eur Mass Spectrom, 1998, 4 (4): 269
- [21] Huang G P, Chen Y J, Tian C G, et al. J Coast Res, 2016, Special Issue 74: 212