技术创新

新型混合模式色谱柱的建立及对水质中多环芳烃的检测

何　洁[1]，傅晶晶[1]，宋　词[1]，何　隆[1]，陆智川[1]，周静秋[1]，王路军[1]，赵　健[2]
1.西南医科大学 药学院（泸州 646000）；2.西南医科大学附属医院 儿科（泸州 646000）

【摘　要】目的 利用合成的新型固定相填料（命名为Sil-VMB-VSS）填充色谱柱，建立混合模式高效液相色谱分析方法，将其用于水中多环芳烃的检测，尤其是检测水样中菲、芴、荧蒽、苊烯的含量，为环境污染物的检测提供新的工具。**方法** 色谱条件：固定相填料为合成的Sil-VMB-VSS，流动相为乙腈/超纯水（1:1），检测波长为254 nm，流速为1.0 mL/min，柱温30 ℃，进样量10 μL。**结果** 在本实验方法下，苊烯、菲、荧蒽、芴标准溶液具有良好的线性关系（$R^2 > 0.999$），苊烯、菲、荧蒽、芴的标准曲线对应的浓度范围为（0.25～10）μg/mL、（0.025～1）μg/mL、（1～50）μg/mL、（0.1～10）μg/mL，其方法精密度和准确性良好，对于多环芳烃（菲、芴、荧蒽、苊烯等）均实现了良好的分离，水中浓度为5 μg/mL的芴溶液平均回收率为100.10%，符合测定的要求，所述回收率测定次数$n = 3$。此外，苊烯的回收率也符合要求。**结论** 利用合成的新型固体填料Sil-YMB-VSS填充色谱柱，建立的新型混合模式色谱柱对水中芴和苊烯的检测较灵敏，为环境污染物的检测提供了新的工具。

【关键词】混合模式固定相；多环芳烃；高效液相色谱法
【中图分类号】 R917　　**文献标志码** A　　DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.02.008

A novel mixed-mode of chromatographic column for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water

HE Jie[1], *FU Jingjing*[1], *SONG Ci*[1], *HE Long*[1], *LU Zhichuan*[1], *ZHOU Jingqiu*[1], *WANG Lujun*[1], *ZHAO Jian*[2]
1. *School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*; 2. *Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China*

【Abstract】Objective A mixed-mode high performance liquid chromatography method was established for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, especially for the determination of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and acenaphenene by using a new stationary phase material (Sil-VMB-VSS). **Methods** Chromatographic conditions: the stationary phase was filled with synthetic Sil-VMB-VSS, and the mobile phase was acetonitrile/ultrapure water (1:1). The detection wavelength was 254 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The new column showed good linearity ($R^2 > 0.999$) in the range of 0.25 ~ 10 μg/mL, 0.025 ~ 1 μg/mL, 1 ~ 50 μg/mL, 0.1 ~ 10 μg/mL for the standard analytes of acenaphthylene, phenanthrene, fluoranthene and fluorene during this experiment, and the method had excellent precision and accuracy. The average recovery rate of fluorene solution with concentration of 5 μg/mL in water was 100.10%, which was in accordance with the requirements of the assay, and the recovery rate was measured 3 times. In addition, the recovery of acenaphthylene was also in accordance with the requirements. **Conclusion** The novel mixed-mode chromatographic column was sensitive to the detection of fluorene and acenaphthylene in water, which provided a new tool for the detection of environmental pollutants.

【Key words】 Mixed-mode stationary phase; Polycyclic aromatic hydrocarbons; High performance liquid chromatography

高效液相色谱（high performance liquid chromatography，HPLC）是分离分析化合物最常用的工具之一，但是单一模式固定相在分离复杂体系样品时还存在一定的局限性[1-2]。而混合模式高液相色谱（mixed-mode high performance liguid chromatography，MHPLC）的发展对传统单一模式色谱起到了极大的补充作用[3-4]。混合模式色谱是一根色谱柱上能够实现两种或者多种分离机理共同主导的分离技术[5]。与单一模式色谱柱相比，混合模式色谱柱具有高选择性、高柱容量、高分辨率等，可以替代两个或多个单一模式色谱柱，以避免材

基金项目：国家自然科学基金青年项目（21804112）；大学生创新创业训练计划（01120662）
通信作者：赵　健，E-mail: zhao7253@126.com
引用本文：何洁，傅晶晶，宋词，等. 新型混合模式色谱柱的建立及对水质中多环芳烃的检测[J]. 西南医科大学学报，2023，46（2）：126-129.DOI：10.3969/j.issn.2096-3351.2023.02.008

料的浪费[5-6]。目前科研工作者开发出了各种各样的MHPLC柱，主要包括反相/离子交换（RPLC/IEC）、反相/亲水（RPLC/HILIC）、亲水/离子交换（HILIC/IEC）混合模式色谱等[7-11]。因此对MHPLC固定相材料进行设计并使其具有更高的分离性能和选择性，将具有重要的意义。点击化学合成反应具有效率高、选择性好、反应条件温和等优点，是一种新型的色谱固定相合成技术。点击化学已成为硅表面配体共价修饰的一种有效方法[12-15]。环境污染物中多环芳烃的检测具有重要的研究意义[16-29]。本项目利用点击化学的方法创新合成一种新型固定相填料Sil-VMB-VSS，以此填料制备色谱柱，建立一种高效液相色谱方法，并将其用于检测水样中的多环芳烃，尤其是检测水样中菲、芴、荧蒽、苊烯的含量，为环境污染物的检测提供新的工具。

1 材料与实验方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器　高效液相色谱仪（岛津LC-2030，日本），天平（岛津ESJ-A，日本），超纯水仪（艾科浦AWL-1002-H，美国），色谱装柱机（海德利森HY-HPLC-S，德国），超声波清洗仪（新芝SB25-12 DTD，中国），烘箱（齐欣DHG-9145A，中国）。

1.1.2 试剂　分析用的标准品苊烯、芴、菲、荧蒽购自中国阿达马斯试剂有限公司，色谱级甲醇和乙腈购自中国阿拉丁化学有限公司，超纯水由实验室超纯水系统纯化后获得，不锈钢空柱管（4.6 mm × 150 mm）购自大连日普利科技有限公司，测试用水取自泸州玉带河。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件　固定相填料为Sil-VMB-VSS（如图1所示）[30]，所有的分析物在进仪器前都经过0.45 μm的滤膜进行过滤，流动相为乙腈/超纯水（1∶1），检测波长为254 nm，流速为1.0 mL/min，柱温30 ℃，进样量为10 μL。

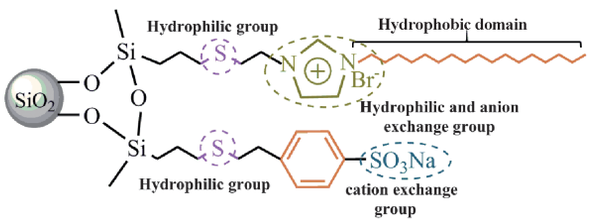


图1 Sil-VMB-VSS固定相填料结构示意图

Figure 1 Schematic diagram of Sil-VMB-VSS stationary phase materials

1.2.2 实际水样的处理方法　取玉带河水样1 000 mL于预先洗净烘干的采样瓶中，经过0.45 μm的滤膜抽滤两遍，再超声10 min，使得水中污染物在不影响其原有形态的情况下溶解且混合均匀，得到处理过后的水用于进样。

1.2.3 标准溶液的处理方法　分别精密称取菲、芴、荧蒽、苊烯0.01 g于15 mL塑料离心管中，用纯甲醇溶液溶解，并定容至10 mL，得到1 mg/mL的标准溶液。

1.2.4 混合溶液的配置　分别精密称取0.01 g的4种多环芳烃于15 mL塑料离心管中，加入甲醇定容至10 mL，得到各种物质浓度均为1 mg/mL的混合标准溶液。

2 结果

2.1 四种多环芳烃的分离鉴别

实验通过高效液相色谱仪主要利用反相保留机理对多环芳烃混合物中各物质进行分离。根据反相高效液相色谱的原理，反相色谱法是以表面非极性载体为固定相，以比固定相极性强的溶剂为流动相的一种液相色谱分离模式。如图2所示，四种多环芳烃在Sil-VMB-VSS固定相上实现了基线分离，并且分离度都大于1.5。通过混合溶液中加标准品的方法确定峰1、2、3、4分别是苊烯、芴、菲、荧蒽。菲的Log P值为4.46，芴的Log P值为3.772，荧蒽的Log P值为5.17，苊烯的Log P值为3.672，同时，它们的保留时间从短到长依次为苊烯、芴、菲、荧蒽，这与四种多环芳烃的极性是呈反相关，这是典型的反相保留特点，因此这四种物质是在反相模式下实现的分离。除了反相模式外，固定相也会与这些多环芳烃类分析物存在π-π相互作用。因此多环芳烃是在反相与π-π相互作用模式下共同实现的分离。

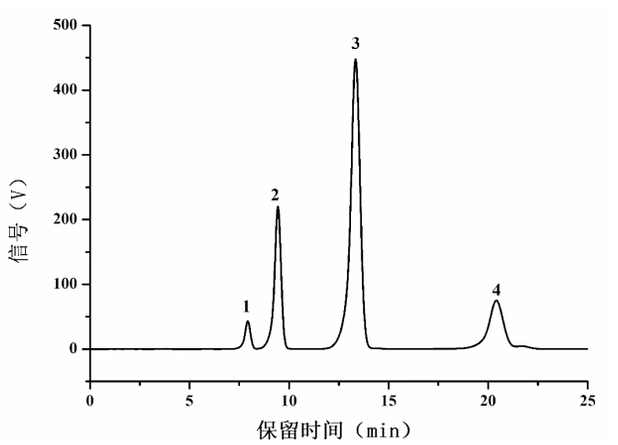


图2 多环芳烃在Sil-VMB-VSS固定相上的分离图

Figure 2 The separation diagram of polycyclic aromatic hydrocarbons on Sil-VMB-VSS stationary phase

注：峰1为苊烯，峰2为芴，峰3为菲，峰4为荧蒽。

2.2 标准曲线制备

将配置好的4种标准溶液进行梯度稀释，分别为苊烯系列标准浓度、菲系列标准浓度、荧蒽系列标准浓度、芴系列标准溶液，见表1。

表1 标准曲线浓度数据

Table 1 Concentration data of standard curve

物质名称	标准物质浓度（μg/mL）						
苊烯	0.25	1	2	2.5	4	5	10
菲	0.025	0.05	0.1	0.5	1		
荧蒽	1	2.5	5	10	25	50	
芴	0.1	0.5	1	2.5	5	10	

将上述各个浓度物质的标准溶液分别进样，每个浓度做3组平行实验。将得到的每个物质每个浓度与峰面积的关系进行绘图，得到峰面积对浓度的标准曲线（如图3所示），各标准曲线回归方程的R^2均大于0.999。结果表明，苊烯浓度在0.25～10 μg/mL内，浓度与峰面积有良好的线性关系；菲浓度在0.025～1 μg/mL内，浓度与峰面积有良好的线性关系；荧蒽浓度在1～50 μg/mL内，浓度与峰面积有良好的线性关系；芴浓度在0.1～10 μg/mL内，浓度与峰面积有良好的线性关系。

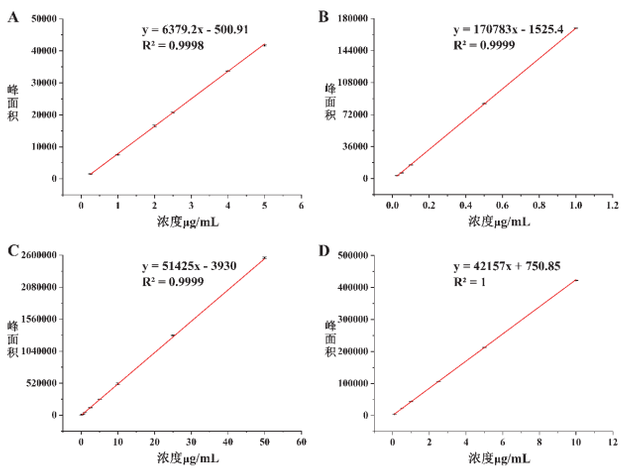


图3　4种多环芳烃的标准曲线图

Figure 3　Standard graphs of four polycyclic aromatic hydrocarbons

2.3　定量下限和检测限

以S/N = 10作为定量下限，S/N = 3作为检测限，经过高效液相色谱法测定菲的定量下限为0.025 μg/mL，检测限为0.005 μg/mL；芴的定量下限为0.1 μg/mL，检测限0.01 μg/mL；荧蒽的定量下限为0.1 μg/mL，检测限为0.025 μg/mL；苊烯的定量下限为0.25 μg/mL，检测限为0.1 μg/mL。

2.4　精密度与准确度

菲选取0.75 μg/mL、0.5 μg/mL、0.05 μg/mL标准溶液分别作为高中低三个浓度，芴选取7.5 μg/mL、5 μg/mL、0.25 μg/mL标准溶液分别作为高中低三个浓度，荧蒽选取40 μg/mL、25 μg/mL、0.25 μg/mL标准溶液分别作为高中低三个浓度，苊烯选取10 μg/mL、5 μg/mL、1 μg/mL标准溶液分别作为高中低三个浓度，每个浓度做3次平行实验，分别计算各个浓度下的相对标准偏差RSD=$\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(xi-x)^2}{n-1}}/x\right)100\%$（$xi$为各浓度点3个样品的实测值，$x$为理论值）和回收率RR =（x/s）× 100%（x为各浓度点5个样品的平均实测值，s为理论值），结果如表2所示。4种标准溶液的各个浓度相对标准偏差和回收率均满足要求，因此，本实验方法的精密度和准确度良好。

表2　4种物质的准确度与精密度

Table 2　Accuracy and precision of four substances

物质名称	浓度μg/mL	RSD（%）	RR（%）
菲	0.75	0.55	90.14
	0.5	0.68	100.22
	0.05	2.83	87.99
芴	7.5	0.25	82.03
	5	0.43	100.17
	0.25	1.63	91.01
荧蒽	40	0.24	99.11
	25	0.62	101.81
	0.25	3.56	94.99
苊烯	10	0.78	99.01
	5	0.42	102.05
	1	2.12	91.19

2.5　样品的测定

取空白水用新型混合模式色谱柱进行一次高效液相色谱检测，再分别向水质中加入浓度为25 μg/mL荧蒽、5 μg/mL芴、0.5 μg/mL菲、1 μg/mL苊烯标准溶液，每组3个平行实验，分别进样检测。将测得的各种物质的峰面积放入标准曲线方程中计算回收率。最终得到水中1 μg/mL的苊烯溶液平均回收率（n = 3）为82.91%，水0.5 μg/mL菲溶液平均回收率（n = 3）为66.67%，水中25 μg/mL的荧蒽溶液平均回收率（n = 3）为73.97%，水中5 μg/mL的芴溶液平均回收率（n = 3）为100.10%。

3　讨论

本研究通过点击化学反应，将离子液体溴化十七烷基咪唑（C_{17}-VMB）和苯磺酸钠（VSS）两种功能单体修饰到硅球表面，制备得到了具有反相/亲水混合模式保留机制的Sil-VMB-VSS色谱固定相。该固定相对于多环芳烃（菲、芴、荧蒽、苊烯等）均实现了良好的分离，在检测水中的多环芳烃方面展现出良好的潜力。在测定水中多环芳烃时，由于国家对工业废水管控严格，各污水采水点采集水样处理后用高效液相色谱法在本实验方法下均无法检测出多环芳烃，因此后续采用将多环芳烃标准溶液加入到采集处理后的水中的办法，以此来检测本新型色谱柱对该4种多环芳烃的准确度。经过反复探索，本研究最终确定流动相在乙腈/超纯水（1:1）的条件下，有利于实现各种标准物质基线分离，通过考察验证方法的定量下限、检测限、精密度、准确度、线性等均符合要求。

上述结果表明，通过制备的新型混合模式的色谱柱，可以应用于分离检测水体中的多环芳烃。由此推测，该新型混合模式色谱柱可应用于分离检测水中其它物质或者空气、土壤中多环芳烃。Sil-VMB-VSS填充的色谱柱建立的高效液相色谱方法，补充了单一的

高效液相色谱法，也为环境污染物的检测提供了新的工具，为新的分离分析工具的制备提供了新的方向和思路。同时，本研究在准确度和精密度的研究方面还需要改进，部分数据过于接近临界值。另外，多环芳烃种类的选取也较少，尚不能代表大多数的多环芳烃物质。

4 结论与展望

本实验采用高效液相色谱法并利用新合成的混合模式色谱柱检测水中苊烯、菲、芴、荧蒽4种多环芳烃。经过方法学验证，本实验方法精密度、准确度均十分良好，在实际测验水中多环芳烃时，苊烯、荧蒽和菲在高中低三个浓度点的回收率均在85%～105%之间，符合要求。本新型色谱柱在对上述4种多环芳烃标准溶液单独检测时，体现出了该C_{18}柱的准确度和精密度。因此该新型混合模式固定相色谱柱为多环芳烃的检测提供了新的工具，更有望用于其它实际样品的检测。此外，本研究工作也为制备新的分离分析工具提供了重要的参考依据与价值。

5 参考文献

[1] 熊赛霞. 高效液相色谱法的特点及应用[J]. 现代食品，2020(3): 199-201.
[2] CHAWLA G, CHAUDHARY KK. A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications[J]. Int J Pharm Chem Anal, 2019, 6(2): 27-39.
[3] BO CM, LI Y, LIU B, *et al*. Grafting copolymer brushes on polyhedral oligomeric silsesquioxanes silsesquioxane-decorated silica stationary phase for hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2021, 1659: 462627.
[4] SANTARELLI X, CABANNE C. Mixed mode chromatography: a novel way toward new selectivity[J]. Curr Protein Pept Sci, 2019, 20(1): 14-21.
[5] 徐基伟，孙元社，唐涛，等. 混合色谱填料的研究进展[J]. 色谱，2015，33(11): 1140-1146.
[6] WANG LJ, WEI WL, XIA ZN, *et al*. Recent advances in materials for stationary phases of mixed-mode high-performance liquid chromatography[J]. Trac Trend Anal Chem, 2016, 80: 495-506.
[7] PELUSO P, MAMANE V, DALLOCCHIO R, *et al*. Noncovalent interactions in high-performance liquid chromatography enantioseparations on polysaccharide-based chiral selectors[J]. J Chromatogr A, 2020, 1623: 461202.
[8] 胡静，刘让东，王薇薇，等. 新型亚微米亲水作用色谱的制备及其在加压毛细管电色谱中的应用[J]. 色谱，2019，37(5): 551-557.
[9] ARAL H, ÇELIK KS, ALTINDAĞ R, *et al*. Synthesis, characterization, and application of a novel multifunctional stationary phase for hydrophilic interaction/reversed phase mixed-mode chromatography[J]. Talanta, 2017, 174: 703-714.
[10] MATTAROZZI M, RIBONI N, MAFFINI M, *et al*. Reversed-phase and weak anion-exchange mixed-mode stationary phase for fast separation of medium-, long- and very long chain free fatty acids by ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2021, 1648: 462209.
[11] LUO QR, ZHONG ZR, ZHENG YC, *et al*. Preparation and evaluation of a poly(N-isopropylacrylamide) derived graphene quantum dots based hydrophilic interaction and reversed-phase mixed-mode stationary phase for complex sample analysis[J]. Talanta, 2021, 224: 121869.
[12] ZHANG SN, ZHANG FF, YANG BC, *et al*. A reversed phase/hydrophilic interaction/ion exchange mixed-mode stationary phase for liquid chromatography[J]. Chin Chem Lett, 2019, 30(2): 470-472.
[13] ZHOU D, LUO QR, ZENG Q, *et al*. Preparation of an aminophenylboronic acid and N-isopropyl acrylamide copolymer functionalized stationary phase for mixed-mode chromatography [J]. J Chromatogr A, 2020, 1627: 461423.
[14] GHAMAT SN, TALEBPOUR Z, MEHDI A. Click reactions: recent trends in preparation of new sorbents and stationary phases for extraction and chromatographic applications[J]. Trac Trend Anal Chem, 2019, 118: 556-573.
[15] GUO ZM, LEI AW, ZHANG YP, *et al*. "Click saccharides": novel separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. Chem Commun (Camb), 2007(24): 2491-2493.
[16] 李可欣，吴蔓莉，高欢，等. 基于流式细胞术的活性多环芳烃降解菌检测技术[J]. 分析化学，2021，49(8): 1357-1365.
[17] 王勤，袁月，邢燕，等. 水中多环芳烃检测技术及污染现状研究进展[J]. 预防医学论坛，2021，27(7): 558-560，封3-封4.
[18] 张赢元，刘俊梅，郭立泉，等. 水产品中多环芳烃菲的检测及生物降解的研究[J]. 食品科技，2021，46(1): 285-291.
[19] 贾双琳，郑松，龙纪群，等. 水中多环芳烃分析技术研究进展[J]. 贵州科学，2020，38(2): 21-30.
[20] 朱利中，沈学优，刘勇建，等. 高效液相色谱法分析水中痕量多环芳烃[J]. 环境化学，1999，18(5): 488-492.
[21] 向彩红，彭明涛，董玉莲，等. 高效液相色谱法测定水中16种多环芳烃[J]. 供水技术，2016，10(1): 54-57，60.
[22] 罗显平. 高效液相色谱法对水中16种多环芳烃分析的研究[J]. 四川环境，2015，34(2): 46-51.
[23] 邢巍，刘兴运，许朝阳，等. 食品中痕量多环芳烃检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12(17): 7036-7042.
[24] 纪春苗，余群. 全自动固相萃取-高效液相色谱法测定水源水中的16种多环芳烃[J]. 分析仪器，2017(6): 70-75.
[25] 陈剑刚，刘中青. 固相萃取-高效液相色谱法测定水源水中16种多环芳烃[J]. 中国卫生检验杂志，2008，18(11): 2206-2208，2233.
[26] 袁继委，王金成，徐威力，等. 凝固漂浮有机液滴-分散液液微萃取结合高效液相色谱法同时测定地表水中多环芳烃和酞酸酯[J]. 色谱，2020，38(11): 1308-1315.
[27] 崔艳杰. 液液萃取-高效液相色谱法测定水中多环芳烃[J]. 科学与财富，2021，13(19): 267-269.
[28] OGAN K, KATZ E, SLAVIN W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by reversed-phase performance liquid chromatography[J]. Anal Chem, 1979, 51(8): 1315-1320.
[29] 田广，刘敏，苏艳丽. 凝胶色谱净化高效液相色谱法测定天然维生素E中苯并芘残留量[J]. 贵州医科大学学报，2020，45(6): 684-688.
[30] REN XJ, ZHANG KL, GAO D, *et al*. Mixed-mode liquid chromatography with a stationary phase co-functionalized with ionic liquid embedded C18 and an aryl sulfonate group[J]. J Chromatogr A, 2018, 1564: 137-144.

（利益冲突:无）

（收稿日期:2022-04-02;修回日期:2022-10-19）