

空气中颗粒物上有机物分离和鉴定的研究*

陈宝生 秦 耘 李茂忠

(中国预防医学科学院环境卫生与卫生工程研究所 北京 100050)

〔摘要〕本文详细研究了色质联机法定性和定量鉴定空气中颗粒物上有机物及样品提取和分组方法,给出了可吸入颗粒物上26种化合物的定量结果和提取物及分组样品生物鉴定的结果。

关键词:颗粒物上有机物 提取 分组 色/质联机

空气中颗粒物直接影响着人体的健康,尤其是农村和冬季燃煤取暖过程中产生的大量颗粒物,其中可吸入颗粒物(粒径 $\leq 10\mu\text{m}$)可进入人体的上下呼吸道,对人体危害更大。

为了研究可吸入颗粒物上有机物成分和生物活性的关系^[1],使用大、中流量或个体采样器,采集室内外可吸入颗粒物。经提取、分离得到不同组分的化合物,分别对每个组分进行气相色谱、色/质联机和生物学鉴定^[2,3,4]。

1 样品采集和分离

1.1 采样:根据需求和现场实际情况,选择大、中流量或个体采样器采集室内外空气中颗粒物。选择一个清洁区作为采样的对照点。采样用的玻璃纤维滤膜,使用前在350℃的马佛炉内烘烤二小时(若有油污等需在550℃加热处理半小时)后,用锡箔纸包好,放在干燥器内备用。称重和采样等操作过程中,应避免手和塑料制品与其接触,尽量使用金属镊子拿取。采完样的滤膜应避光保存放入干燥器内,若长期不用,就放入低温冰箱(-40℃)保存。根据采样器的流量和采样时间,计算出采样体积,并根据理想气体方程,对采样体积进行校正。由采样前后的重量差(要达到恒重),求出采集颗粒物的量,计算出采样条件下大气中颗粒物的浓度。

1.2 提取:所用的玻璃仪器可放在新配制的酸性洗液内浸泡过夜,也可用洗涤灵洗净后,放在烘箱(350℃)烘烤过夜(8小时),去掉残存有机物。一般用二氯甲烷在索氏提取器内提取颗粒物上有机物,也可用苯或环己烷作溶剂。Stanley等^[5]认为用二氯甲烷提取颗粒物上苯并[a]芘的效率接近100%。溶剂用量和提取时间,可根据滤膜上样品量和提取回流速度等条件来确定。一般100毫克颗粒物用200毫升二氯甲烷提取8到12小时即可

1994年7月20日收

* 第6届全国F四级质谱学术会议论文

(水浴温度 $\leq 80^{\circ}\text{C}$)。若只是为了分析颗粒物上多环芳烃化合物并减少二氯甲烷对人体的危害,可用环己烷代替二氯甲烷作为提取液,提取条件相似。准确测量总提取液的体积,分取一定体积的提取液,浓缩、干燥后恒重,从而推算出有机物在颗粒物中的含量(重量法)。提取物在旋转蒸发器(60°C)中蒸发浓缩,吹氮(控制好氮气流速)浓缩近干。室温下在通风橱内放置,蒸发干燥后,存放在干燥器内,准备作分离工作。

1.3 分离过程和结果:分离分组的目的,对色质联机鉴定来说,主要是为了去掉不同组分中的化合物在色谱分离和质谱鉴定过程中的相互干扰。对于多环芳香类化合物(PAC)的鉴定,主要是为了去掉干扰测定的脂肪烃,并将多环芳香类化合物分成各个组分,以便于研究各组分的成分与生物活性。常用中性氧化铝和硅胶层析柱法进行颗粒物上有机物的分离分组,其步骤见图1、2。

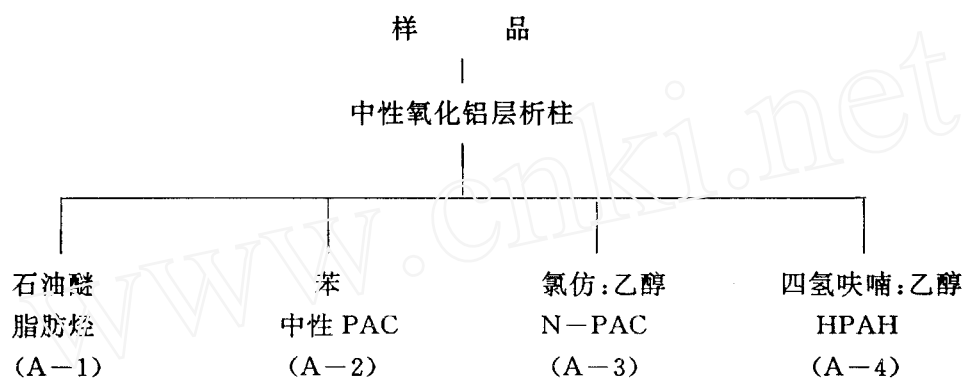


图1 中性氧化铝柱层析法流程图

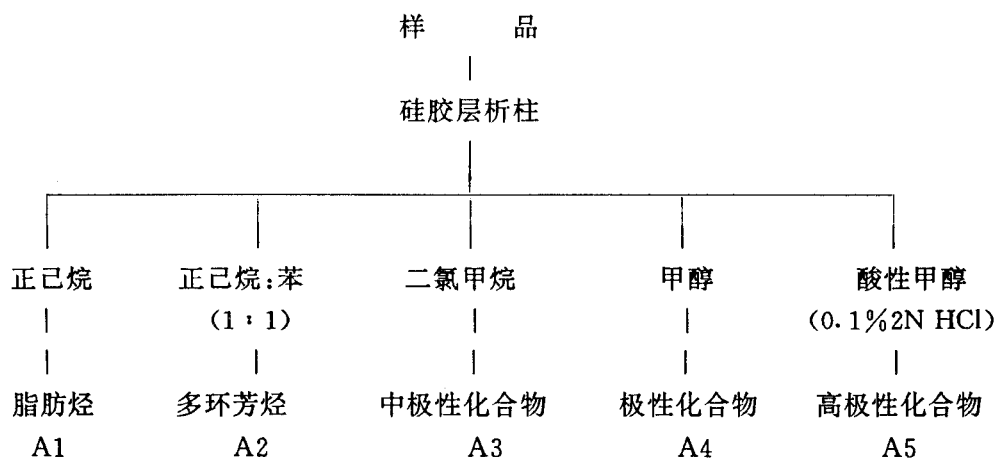


图2 硅胶柱层析法流程图

1.3.1 中性氧化铝柱层析法:为了鉴定各个组分的成分与生物活动性,采用如图1所示

中性氧化铝柱层法流程。将空气中颗粒物上有机提取物分成四个组分。准确称取(万分之一)颗粒物二氯甲烷提取物 500 毫克,用三氯甲烷溶解后,加入 2 克经活化后的中性氧化铝(200—300 目),搅拌均匀,室温下蒸发掉多余的三氯甲烷。将 10 克经活化过的中性氧化铝湿法装柱,再将吸附了样品的中性氧化铝装入柱顶,柱顶呈深棕色。按图 1 的流程,用 40 毫升石油醚(沸程 60—90℃),90 毫升苯,110 毫升三氯甲烷(含 0.75%乙醇)和 90 毫升四氢呋喃(含 10%乙醇)依次进行洗脱。得到 A1、A2、A3 和 A4 四个组分。按中性氧化铝柱层析法分离某地燃柴和燃煤室内颗粒物二氯甲烷提取物的实验结果,如表 1 和表 2 所示。该分组方法的质量回收率为 52~73%。三次平行实验的相对误差为 10%。在分组实验过程中,四个组分的色带颜色差别明显,为分组提供了有利条件。在一般的实验条件下,单柱一次处理样品质量不宜超过 500 毫克。

表 1 燃柴室内颗粒物二氯甲烷柱层析分组结果*

组 分	重量(毫克)	含量(%)	洗脱液颜色	蒸干后颜色
A1	6.3	1.26	无色透明	白色残渣
A2	33.8	6.76	黄绿透明	桔红色残渣
A3	177.6	35.52	黑红不透明	黑红色
A4	43.6	8.72	深红不透明	深黑红色
$\sum_{i=1}^4 A_i$	261.3	质量回收率(%)	52.26	

* 样品加入量 500 毫克

表 2 燃煤室内颗粒物二氯甲烷柱层析分组结果*

组 分	重量(毫克)	含量(%)	洗脱液颜色	蒸干后颜色
A1	5.1	1.01	无色透明	白色残渣
A2	107.9	21.58	深红色透明	桔色粘稠
A3	195.4	39.08	黑红不透明	黑色
A4	57.0	11.40	深红不透明	黑红色
$\sum_{i=1}^4 A_i$	365.4	质量回收率(%)	73.08	

* 样品加入量 500 毫克

1.3.2 硅胶柱层析法:硅胶柱层析分组法中(图 2),提取物和硅胶及各种洗脱溶剂用量之间的关系如表 3 所示。

表3 硅胶柱层析法分组中提取物、硅胶和洗脱剂之间关系

提取物 (毫克)	硅胶用量 (克)	洗脱剂的体积(毫升)				
		己烷	己烷:苯(1:1)	二氯甲烷	甲醇	酸性甲醇(0.1% 2N HCl)
1-5	1	2.5	4	4	4	0
50	10	50	150	150	150	10
100	20	80	250	250	250	20

实验过程中,样品加入柱顶的方式类似于上述过程。不同点是用二氯烷溶解提取样品。硅胶柱析法的实际分析结果^[6]见表4。

表4 硅胶柱层析分组结果

项目 组分	质量回收 (毫克)	洗脱剂用量 (毫升)	洗脱 颜色	蒸干后 颜色	色带峰值洗脱下来时 用去洗脱剂量(毫升)
A1	5.3	175	无色透明	白色	--
A2	37.1	250	黄色	桔红	~50
A3	14.0	350	浅黄	桔黄	无明显色带
A4	59.4	300	棕红	茶色	~50
$\sum_{i=1}^4 A_i$	115.8	质量回收率(%)	94.4		

样品加入量为126.7毫克,硅胶40克(100目)

1.3.3 改进后的中性氧化铝柱层析法:为配合燃烧不同燃料产生的可吸入颗粒物上有机物的生物致癌性实验,将原来的中性氧化铝柱层析法增加了第五组(甲醇洗脱物)。其实验过程如图3所示。某肺癌高发区农民居室内可吸入颗粒物上有机物的提取物利用改进后的中性氧化铝柱层析分组的结果^[4]如表5所示。

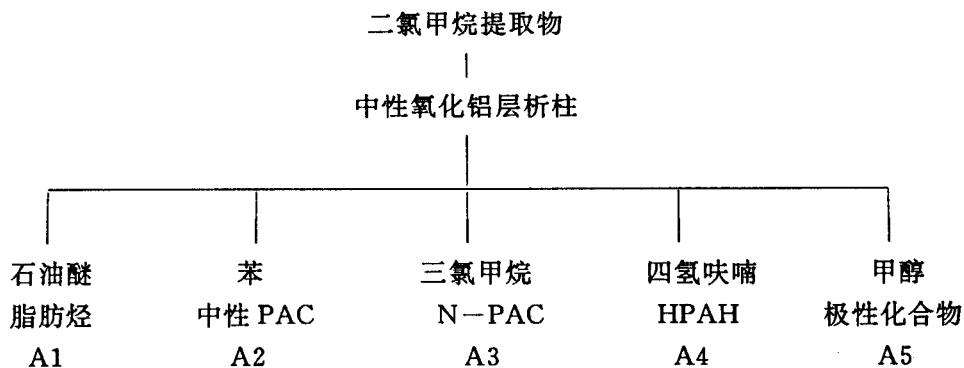


图3 改进后中性氧化铝柱层析示意图

表 5 提取物柱层析分组结果

组分	重量(毫克)	相对含量(%)	试剂用量(毫升)	洗脱液颜色	蒸干后颜色
A1	45.3	11.65	80	无色透明	白 色
A2	135.0	34.72	130	黄色透明	桔红色
A3	131.0	33.69	150	亮红透明	黑红色
A4	38.6	9.93	150	茶色透明	棕黑色
A5	38.9	10.01	150	红色透明	茶 色
$\sum_{i=1}^5 A_i$	388.8		质量回收率(%)	83.5	

* 样品加入量 436.9 毫克, 中性氧化铝 10 克(100 目)

2 分组样品的鉴定

2.1 色/质联机鉴定

2.1.1 定性鉴定: 空气颗粒物上有机物色/质联机分析结果^[5]表明: 两种分组方法的 A1 和 A2 组分均可以给出满意的结果。中性氧化铝分组的 A3、A4、A5 组分和硅胶分组的 A3、A4 组分, 由于样品的极性问题, 在色/质联机的 TIC 上出峰很少, 结果不佳。硅胶分组法中的 A5 组分未进行过色/质联机分析。结合样品的生物活性^[1]考虑, 两种分组方法中, A2 组分进行色/质联机定性鉴定更有实际意义。

定性鉴定中性氧化铝柱层析分组 A2(多环芳烃)组分色/质联机鉴定条件见表 6。

表 6 A2(多环芳烃)组分色/质联机鉴定条件

气相色谱柱	DB-5 弹性石英毛细柱, 内径 0.25 毫米, 长 30 米
气化室温度	290℃
程序升温	80℃到 120℃, 20℃/分; 120℃到 280℃, 4℃/分, 保持 30 分
进样方式	GROB 进样
载 气	氮
质谱条件	发射电流 0.25 毫安; 倍增器高压 1.2 千伏; 电离方式 EI; 轰击电子能量 70 电子伏
软件系统	INCOS 软件

A1、A3 和 A4 组分的色谱升温程序分别是:

A1: 60℃ (1 min) $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250℃ (8 min)

A3: 60℃ (1 min) $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ 280℃ (8 min)

A4: 60℃ (1 min) $\xrightarrow{6^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250℃ (8 min)

质谱分析的条件和 A2 组分类似。硅胶柱层析法分组样品色/质联机定性鉴定条件同表 6。根据计算机检索,标准品核对及谱图解析给出定性鉴定结果。燃煤煤室内可吸入颗粒物二氯甲烷提取物中性氧化铝柱层析分组 A2(多环芳烃)组分定性鉴定出 75 种化合物^[4],主要是多环芳烃母体及其衍生物。定性鉴定结果的分类见表 7。

表 7 A2 组分定性鉴定结果分类

分类 环数	多环芳 烃母体	多环芳 烃 甲基衍生物	氧杂环 母 体	氧杂环甲 基衍生物	其它化合物
二环	6	5			1
三环	10	21	2	1	
四环	4	16			
五环	7				
六环	2				
总计	29	42	2	1	1

2.1.2 定量鉴定^[7]:空气中颗粒物上有机物,特别是燃煤污染产生的颗粒物上有机物中有生物活性的物质,多是一些多环芳烃及其衍生物。所以在色/质联机定量分析过程中 9-苯基蒽作为内标化合物。回收率指示化合物(Surrogate Spiking Compounds)选择蒽-D12 和苯并[K]荧蒽-D12。根据大量实际样品定性分析结果并参阅有关燃煤污染的文献资料,选择了表 8 中所列 26 种具有一定生物活性的多环芳烃类化合物,作为目标化合物。将目标化合物和回收率的指示化合物配成浓度为 10ng/μL、5ng/μL 和 1ng/μL 三种不同浓度的混合标准溶液。内标化合物在三种不同浓度的标准混合溶液中均保持恒定为 10ng/μL。用 EI GC/MS 法分析标准溶液,在整个定量浓度范围内求出响应系数 (R_f) 的校正曲线。根据化合物的特征离子(分子离子)和相对保留时间及 EPA/NIH 标准谱来鉴定样品中的目标化合物。按下式根据样品中目标化合物特征离子的峰面积进行定量:

$$C_x = \frac{A_x \times C_{is} \times F_v}{A_{is} \times R_f}$$

其中, C_x = 在提取物中发现的目标化合物的总量(ng), A_x = 目标化合物的分子离子峰面积, A_{is} = 内标的分子离子峰面积, C_{is} = 内标的浓度(10ng/μL), R_f = 响应系数, F_v = 样品提取物最终体积。

利用大流量采样器采集居室内燃烧不同燃料产生的可吸入颗粒物。二氯甲烷提取物中目标化合物的色/质联机定量结果示于表 8。

表 8 可吸入颗粒物上多环芳烃化合物的定量分析结果

目 标 化 合 物	浓度($\mu\text{g/g}$ 提取物)	
	燃烟煤	燃木柴
喹啉	12	10
异喹啉	7	12
菲	2540	599
蒽	734	117
1-甲基菲	791	310
荧蒽	2090	427
芘	1540	280
苯并[b]萘[1,2-D]噻吩	21	52
环戊二烯并[cd]芘	918	141
苯并[a]蒽	1630	135
蒎	1490	143
1-甲基苯并[a]蒽	314	15
5-甲基蒎	324	7
1-硝基芘	15	0
苯并荧蒽	1520	103
7,12-二甲基苯并[a]蒽	55	23
苯并[e]芘	1340	70
苯并[a]芘	984	89
3-甲基胆蒽	52	0
吖啶[1,2,3-cd]芘	587	66
二苯并[ac]和[ah]蒽	441	51
苯并[ghi]芘	1140	54
二苯并[al]芘	0	24
晕苯	394	42
二苯并[ae]芘	954	28
二苯并[ai]芘	71	0

2.2 生物学鉴定:用大流量采样器采集了某地农村不同燃料燃烧产生的可吸入颗粒物,经二氯甲烷提取后,按上述改进后的中性氧化铝柱层析法将提取物分成 A1、A2、A3、A4 和 A5 五个组分。对原二氯甲烷提取物和分组后的五组样品分别进行致突变性鉴定、皮肤致癌试验^[1]和色/质联机定性鉴定^[4]。燃烟煤和燃木柴产生的可吸入颗粒物的提取物和分组样品致突变试验结果表明:A1(脂肪烃)组分没有致突变性,A5(甲醇洗脱物,极性化合物)组分几乎没有活性。A2、A3 和 A4 组分均有较强的致突变性。A2(PAH)组分需要活化,只有加 S9 才表现致突变性;A3 和 A4 组分在不加 S9 时也有较强的直接致突变性,

其中A3(含氮杂环化合物)致突变性最强。由于A3和A4组分所含化合物极性较大,在色/质联机上出峰很少,鉴定结果不佳。A2组分色/质联机鉴定结果^[4]很理想。提取物和分组样致突变性试验结果如表9所示。

表9 可吸入颗粒物有机物提取物及其组分致突变性(TA₉₈, R/100μg)

		组 分 (x±s)									
原有机提取物		A1		A2		A3		A4		A5	
燃煤	-S9	47.8 ± 1.5	0	48.6 ± 6.4	112.3 ± 7.5	7.81 ± 6.9	0				
	+S9	59.8 ± 10.0	0	182.0 ± 3.4	205.3 ± 3.1	118.9 ± 10.5	0				
燃柴	-S9	46.2 ± 6.0	0	66.1 ± 6.0	66.3 ± 0.5	74.3 ± 10.0	0				
	+S9	58.6 ± 13.2	0	97.8 ± 11.5	103.4 ± 13.7	75.8 ± 20.4	0				

3 讨论

3.1 利用两种分离分组的方法,从质量回收率、色带颜色、洗脱剂用量等,均可满足实际工作的需要。若用色/质联机法鉴定颗粒物上多环芳烃(PAH),只需己烷(或石油醚)洗脱后,收集苯(或己烷/苯[1:1])洗脱物,浓缩后即可进行测定。中性氧化铝柱层析法,柱容量大。单柱一次可处理500毫克样品,适合于生物或动物实验^[1,4]的要求。若样品需进一步分离,用中性氧化铝柱层析法效果较好。两种分离分组的方法,在实际应用过程中常会出现用相同的洗脱剂洗脱效果不同,如表3和表4所示。要保证洗脱效果重复性,除了严格控制洗脱条件一致外,几次实验用的中性氧化铝或硅胶的活性是否一致是最重要的一环。这涉及到活化的条件,温度、粒度及保存条件。因此在开始一批正式实验前,一定要通过预实验确定有关的实验条件、试剂用量等。

3.2 色/质联机法鉴定某农村居民室内燃煤所致室内空气中可吸入颗粒物中多环芳烃类化合物,共鉴定出75种化合物,其中多环芳烃母体化合物29种,多环芳烃甲基衍生物42种,含氧杂环3种,其它1种。在甲基衍生物中以甲基菲、甲基芘和甲基苯并[a]蒽为主。化学结构及其衍生物对多环芳烃的生物活性有决定性的影响。众多的多环芳烃甲基衍生物的存在和当地肺癌的高发之间的关系有待进一步研究。对农村居室内挥发性有机物研究^[8]表明,该地肺癌高发区室内污染的特点以苯系物及其衍生物为主要污染物。

3.3 色/质联机法定量是根据相对保留时间和谱库检索定性及特征离子峰面积定量。这可避免色谱法中不同化合物具有相同保留时间而出现定性的差错。对于色谱未能分开的相邻的两个峰,利用特征离子可将其分开,因而提高了定量的准确性。另外,色/质联机法一次可定量分析几十种具有不同特性的化合物^[7]。若同时完成这些工作需要几台具有不同检测器气相色谱和高压液相色谱仪,因而色/质联机定量是一种非常经济和实用的方法。在色/质联机法定量分析研究过程中,利用质谱的特点,采用同位素标记化合物作内标或回收率指示化合物,使定量分析在严格质量保证和质量控制(QA/QC)条件下进行,因而大大提高了定量结果的准确性。

参 考 文 献

- 1 李学明,陈宝生等. 中华预防医学杂志,1989,23(6):358
- 2 陈宝生. 国外医学(卫生学分册),1983,10(3):104
- 3 陈宝生. 卫生研究,1985,14(3):13
- 4 陈宝生等. 质谱学报,1988,9(增刊):96
- 5 Stanley T W *et al.* Environ Sci Technol,1967,1,927
- 6 陈宝生等. 中国第四次全国有机质谱学会议论文集,西安,1987
- 7 陈宝生. 质谱学报,1993,14(2):54
- 8 陈宝生等. 环境与健康杂志,1992,9(1):26

Study on Fractionation and Identification of Organic Compounds on Particulate in Air

Chen Baosheng, Qin Yun, Li Maozhong

(Institute of Environmental Health and Engineering Chinese Academy of
Preventive Medicine, Beijing 100050, China)

Received 1994—07—20

Abstract

The paper studied the GC/MS method for qualitative and quantitative identification of organic compounds on particulate in air, the extraction and tractionation of samples in detail. The quantitative results of 26 compounds on inhalable particulate and bioassay result of extraction and fractionation samples have been given.

Keywords: organic compounds on particulate, extraction and fractionation, GC/MS.