

S219320

环境污染分析译文集

第十四集



PDG

环境污染分析译文集

第十四集 一九八二年十二月

编辑：中国科学院环境化学研究所
情报资料研究室
(北京 934 信箱)

印刷：中国科学院
环境化学研究所印刷厂

工本费：1

目 录

(一) 综述与评述

1. 柴油机烟尘萃取物致突变馏份中多环芳烃(PAHs)衍生物的鉴定..... (1)
2. 供生物试验用水中有机物的浓集方法..... (30)

(二) 有机污染物的分析

3. 键合固定相用于高效液相色谱测定废水中多环芳烃的评价..... (36)
4. 环境样品中含硫气溶胶的稳定性和分析..... (45)
5. 液相色谱—质谱法鉴定开蓬水合物、克利凡和灭蚊灵..... (51)
6. 土壤中多氯联苯快速分析的新方法..... (58)
7. 阴离子表面活性剂的溶剂提取—乙基紫分光光度法测定..... (67)
8. 水中非离子表面活性剂的予浓缩和快速分光光度测定..... (77)
9. 浓集饮水中有机污染物时XAD-2之杂质问题..... (84)

(三) 无机污染物的分析

10. 石墨炉原子吸收法测定城市雪中的重金属..... (89)
11. 不使用高氯酸消解同时测定植物组织中的砷、铝、铁、锌、铬和铜的方法..... (94)
12. 用钨丝予富集无焰原子吸收分光光度法测定水中 10^{-12} 克/克级的镉、铜、铅及锌..... (98)
13. 用箔铝薄层测定汞化合物..... (104)
14. 选择性测定无机砷的尿中总代谢物的快速方法..... (110)
15. 电感耦合氩等离子体发射光谱法测定水、鱼和沉积物中的砷和硒..... (115)
16. 用异菸酸和巴比土酸分光光度法测定氰化物..... (119)
17. 单人用固体吸附剂采样、离子色谱法监测 NO_2 和 SO_2 的方法..... (124)

(四) 采、制样及质量控制

18. 合成吸附剂对大气取样的干扰..... (128)
19. 二段和六段安德森冲击式采样器收集生物活性气溶胶性能的比较..... (135)

C0128985



20. 采集空气中农药和半挥发性工业有机物的便携式采样器	(143)
21. 水样的保存方法	(152)
22. 标准合成水样配制方法	(162)
23. 血和肾皮质中质量控制样品制备方法的研究	(169)
24. 质量控制方法的某些效能	(175)
 (五) 其它	
25. 用生物实验和化学分离相结合的方法从饮用水中分离致变物	(189)
26. 直接在薄层层析板上进行沙门氏菌试验检测复杂样品中的致突变物	(198)
27. 数字计算机在分析化学中的近代应用	(202)

1、柴油机烟尘萃取物致突变馏分中 多环芳烃(PAH)衍生物的鉴定

D. Schuetzle等

摘 要

在柴油机排放的烟尘物质的可溶性有机物(即SOF,一般来自点污染源,大气等)中,包含着数百种有机组分。采用正相高效液相色谱(HPLC),可把它分离为便于进一步作化学分析和生物实验的亚馏分。这些馏份是由非极性的组分(PAH),中等极性的(或称过渡性的)组分,及强极性的组分组成的。经鉴定,其中的非极性馏份是由PAH和脂肪烃类物质所组成的。而在过渡性组分及强极性组分中,则含有一些特殊的化合物。它们之中的大多数尚属未知物。这是由于这些化合物不稳定,极性很强,挥发性低,而且在SOF中的浓度又很低,所以很难得到这些化合物的分析资料。利用鼠伤寒沙门氏菌实验进行的致突变试验结果表明,与非极性(PAH)及极性馏份相比,致突变活性的绝大多数在过渡馏份中。

本文阐述了测定HPLC馏份组成的各种色谱和质谱技术。采用高分离度的气体色谱(HRGC)/高分辨质谱(HRMS)、HPLC和直接进样的高分辨质谱,测定了柴油机烟尘物质的过渡性馏份中百余种物质以后,发现该过渡馏份中包含了大量的PAH衍生物,并已确定,这些衍生物是由PAH的羟基物、酮、醌、羧酸、酸酐和二羟基等组成的。还初步鉴定出它包含三个PAH的硝基化合物,并已确定,其中之一为1-硝基蒽在观察到的过渡馏份和总萃取物的致突变活性中,1-硝基蒽所引起的作用,大约分别为45%和30%。HPLC可获得95%的总量回收率和致突变活性。

本文还讨论了分析过程中氧化问题,以及对生物试验结果可能产生的影响。

引 言

柴油机排出的烟尘物质的化学组成很复杂,可能有数百种化合物存在⁽¹⁾。可以确信,在有机溶剂可萃取的馏份中,包含着具有重要环境意义的组分。

由于存在着许多化合物,采用了多种方法,使其中可溶性的有机馏分(SOF),分离成为由具有相同功能团的化合物组成的亚馏分⁽²⁻⁷⁾。这些馏分是由酸性、碱性,及中性的馏分所组成的。其中中性馏分可用HPLC进一步分离为非极性的,中等极性的和强极性的馏分,分别称之为PAH馏分,过渡馏分和氧化馏分。

用Ames的沙门氏菌致变生物试验(Ames试验),来测定大气飘尘⁽⁷⁻¹⁷⁾,发电厂烟尘⁽¹⁸⁾,车辆排放物⁽¹⁹⁻²²⁾,和香烟烟雾⁽²³⁾样品中的SOF的致突变性。表I扼要地列出这方面的数据。大多数尘埃萃取物的Ames试验,响应在500—5,000回变菌落数/mg之间(TA98菌株,未经酶激活, -Sq)。这些值可与苯并(a)蒽的致突变活性相比较(45,000回变菌落数/mg,经酶激活, +Sq)。

近来,柴油机排出的烟尘扩散对于健康和环境可能造成影响的问题,日益被人们所重

视^[24-26]。由EPA和其它研究者^[3,7,16,19,-21]利用 Ames 试验所做的调查表明,柴油机烟尘萃取物中的大多数致变活性,集中在一些馏分中而不是PAH馏分^[20,27]。对于大气飘尘的观察,也得到相同的结果^[12,15,16]。

在这些研究以前,人们认为PAH是尘埃中主要的引起致突变活性和可能致癌的活性物质^[28-31]。

最近的研究表明,一些PAH化合物能很容易地与滤膜介质^[32]、氮氧化物^[33,34]、氧化硫^[35]、硫酸气溶胶^[36]、臭氧^[34-37]和气态光化学烟雾^[34]反应。当过滤了的气态光化学烟雾通过一张玻璃纤维滤膜,并与涂在滤膜上的苯并(a)芘(Bap)反应后,已初步检出其中含有许多化合物,包括含二氢醇、二酚、酚、和醌的Bap化合物。以及通过开环氧化作用形成的二羰基化合物^[34]。还发现一些PAH的硝基衍生物是直接致突变物。

在模拟条件下,用钴的 r -射线:254nm光紫外线和可见光照射来研究PAH的氧化作用^[37]。发现试验产物对于各种鼠伤寒沙门氏菌株是直接致突变物(-Sq)。在暴露于钴 r -射线:7天和可见光18天后,Bap的致变活性分别从本底值增加到7,200和6,240回变菌落/mg。因此,在这些氧化实验中,可能产生了一些新产物,这些物质的存在,致使大气飘尘有机萃取物的中等极性和强极性馏分在生物试验中呈现出致变性。然而,这些物质的化学性质,目前仍属未知。

近来,许多研究者报导了鉴定HPLC馏分中的一些PAH衍生物的方法。Erickson等人报导了鉴定一柴油机烟尘萃取物中的烷基-q-蒽酮的情况;Chaigneau^[39]等人发现,在煤烟中有一分子量相当于硝基萘的化合物;Rappaport等人^[40]初步鉴定了柴油机烟尘萃取物中的一个高致变性馏分中的环戊烯并(c,d)芘二甲酸酐。

我们试验室的初步工作表明,过渡馏分中主要含有PAH氧化物(OXY-PAH),氧化馏分中含有PAH氧化物和杂环化合物氧化物。本报告的目的是报导关于柴油机烟尘萃取物化学成份分析的一项范围广泛的研究。

在本项研究中,采用鼠伤寒沙门氏菌致突变试验,来鉴定经HPLC分离所获得的各种烟尘萃取物馏分,然后对其中致变活性最强者,再用HPLC^[46]、气体色谱/质谱(GC/MS)和高分辨质谱技术进行分析。

采用直接进样质谱技术,以(1.5K—2.0K)中等分辨及(12—15K)高分辨方式操作,获得精密质量数的GC/MS技术,来分析馏分。直接进样技术对于分析这些强极性的,不太稳定的,不适于采用GC分析的化合物来说,是很方便的,而HRMS所提供的精确分子式,可用作定性的参考。

本研究的主要目标是测定过渡馏分的化学组成。因为它在Ames致变的SOF中占50%以上。对于一个PAH馏分中的 β 次馏份和氧化物馏分已作出初步结果,进一步的结果将在以后的报告中公布。

本研究的另一个目标是,测定在分析过程中PAH以及PAH氧化物可能变换生成的其它物质。已知许多PAH化合物对空气敏感,易氧化。例如,文献中已报导了9、10-二氢蒽萘对空气非常敏感,能迅速氧化成为9、10-菲醌。

实 验

烟尘的收集——萃取

利用一抽吸排气管把质量很轻的柴油机烟尘样品收集在T60A20Pallaflax滤膜上(用

聚四氟乙烯浸涂过的玻璃纤维滤膜), 本报告中谈到的两种不同样品, 在表 II 中标记为 *M-1* 和 *OL-1*。用二氯甲烷 ($MeCl_2$) 对烟尘滤膜进行索氏萃取, 萃取液 (约为 $1mg/ml$) 在使用前保存在干冰温度条件下, 在光线柔和的室内进行分析以避免可能产生的光化学变化。

表 I 一些环境尘埃的溶剂萃取物中鼠伤寒沙门氏菌的致变活性

尘埃来源	致突变性 (回变菌落数/ mg) ^a
无催化剂的汽油发动机 ²⁷ (五个平均值)	900
四缸柴油发动机 ¹⁹	2400
卡车柴油机 (4 冲程) ²⁷	4300
香烟烟雾冷凝物 ²³	1100
纽约市 (冬季) ¹⁸	1300
纽约市 (夏季) ¹⁸	1600
居住区 (日本) ¹⁰	44—1800
工业区 (日本) ¹⁰	290—2200
发电厂 ¹⁸	2600
炼焦厂	1200

a TA 98 菌株未经 Sg 激活

溶剂和标准品

所有溶剂均是“全玻重蒸”UV级的, 由Burdick 和Jackson 处获得。PAH标准品由Aldrich, Analabs 公司和Columbia 有机化学公司提供。PAH 衍生物是由多方面获得的, 其中包括由其它研究实验室提供, 向商店购买以及自己合成。常用的PAH 衍生物约有125种。

高效液相色谱 (HPLC) 分离

采用Watess HPLC 系统分离烟尘萃取物, 该系统由两台6000型泵, 一个U6 K 进样器, 一台660型梯度淋洗程序器, 一台440型两个微型流动池的紫外检测器及一台 Schoeffel、FS—970LC型的荧光分光检测器组成。

在HPLC 分析中同时应用了低分离度和高分离度两种柱子来分离萃取物。低分离柱为 $3mm \times 30cm$ 不锈钢柱内装 Biosil—A (Bio—Bad (20—40 μ)) 填料, 在其前面是一支 $4mm \times 5cm$ 的不锈钢予柱, 内装Biosil—A填料。荧光鉴定器设定的激发波长为 $\lambda_{EX} = 313nm$, 发射波长为 $\lambda_{EM} \geq 418nm$ 。流动相流速为 $1ml/min$ 。进注几次2—3ml的乙腈来冲洗柱子以建立一个恒定的 σ 空白值。接着, 用5%的二氯甲烷、正己烷混合溶液冲洗8分钟, 在柱内注入 $25\mu l$ 的 $MeCl_2$ 样品萃取液, 以5%的 $MeCl_2$ 、己烷溶液作为流动相进行洗脱。17分钟后, 在等比条件下, 以5%/分的 $MeCl_2$ 递增, 至36分钟时, 流动相达到含100%的 $MeCl_2$, 然后维持17分钟。注入2.0ml的乙腈来洗脱 σ_1 峰, 再注入2.0ml的甲醇来洗脱 σ_2 峰。平衡后, 开始一个相反的梯度程序 (10%己烷/分), 使流动相回到5%的 $MeCl_2$ 、己烷比例, 以准备下一次分析。

高分离度技术使用了一支Watess公司的正相径向压缩柱 (Rcss, Radical—PAKB)。用己烷, $MeCl_2$ 和乙腈作为流动相。在一些分析中可用氯仿代替上述溶液系统中的 $MeCl_2$ 。在本研究中, 这两个流动相系统对各试验的化合物洗脱顺序一致。

分析时, 用正己烷冲洗色谱柱, 进样20分钟后, 利用梯度程序器中溶剂梯度设定装置把

洗脱液从正己烷改变到 $MeCl_2$ 。(曲线9—溶剂程序器中的一个非线性梯度预设装置)先用5% $MeCl_2$ —己烷溶液洗脱,10分钟后,用近似指数级数的程序,在后半个梯度周期里把流动相浓度程序升至含100%的 $MeCl_2$ 。梯度结束后,维持6分钟100% $MeCl_2$ 。然后通过一只安装在泵的输液管线上的气动控制4通阀,把 $MeCl_2$ 变换为乙腈,然后用乙腈等比洗脱柱子10分钟,再反向程序回到原来的正己烷洗脱条件。

一支 $8mm \times 25cm$ 的 Michel—Miller 的玻璃制备柱用来分离适当体积的馏份,供 Ames 试验和质谱分析用。一支 $9mm \times 50cm$ 的 Maqnum—9 (Whatman) 反相柱用来分离 NI—1 样品 (图1) 的 β 峰,此时,甲醇作为流动相,流速为 $4ml/min$ 。可分离出30个馏份。分析柱洗脱峰形见图1,除了几个馏份的基线分离情况稍差一些之外,制备柱的分离情况与分析柱的分离情况类似。

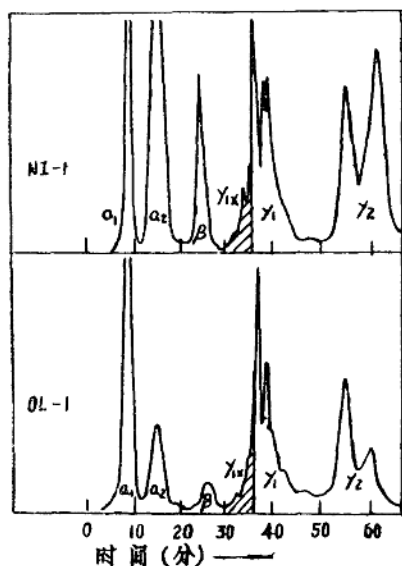


图1 用 $3mm \times 30cm$ 正相 Biosila (20—10 μ) 硅胶柱对柴油烟尘萃取样品 OL—1 和 NI—1 进行 HPLC 分离的色谱图。荧光检测器 $\lambda_{ex} = 313nm$; $\lambda_{em} = 418nm$ 。

正如本实验室以前曾报告过的除去脂肪烃的方法那样,利用 Griminer 的液—液分配以及 Sephadex—LH20 柱进行予分离。结果, α_1 和 α_2 馏份来分离开,而脂肪烃类被选择性地除去。然后再用一支25米长的 Doxsi/300 毛细管柱进行 GC/MS 分析。

致突变性实验

利用需要组氨酸的鼠沙门氏菌株 TA—98 对低分离度 HPLC 所收集的馏份进行实验。去除样品中的溶剂,把剩余物溶于二甲基亚砜中。用肝微粒体 (+S9) 进行激活⁽⁴²⁾。取每一馏份的混匀试样进行试验,保证在剂量响应曲线的线性范围内至少有三点。每一馏份的致突变活性 (An) 以“回变菌落数/mg”为单位。总萃取物的致突变活性 (AT) 用剂量响应曲线图的最小二乘方直线来确定。1—硝基芘为直接致突变研究的标准品。由于 TA98 菌标对柴

高分辨质谱

高分辨质谱 (HRMS) 分析操作是在一台 Vacuum Generators 公司的 Micromass Zab—2F 上进行的。以电子轰击方式 (70 电子伏特) 在 11,000 到 15,000 分辨率操作,用直接进样方式导入试样。MS 离子源保持在 $240^\circ C$, 进样探头温度由 $20^\circ C$ 程序升到 $300^\circ C$ 。

气相色谱/质谱

用一个单级玻璃喷射分离器,把一台 VG—Micromass MM—16 质谱仪与一台 Varian 1400 GC 气相色谱仪连接起来,进行 Gc/MS 分析。用 6 英尺长,装有 1% SP2250 的 Supelco—pori 担体或 2% Doxsi/300 的 Ultrabond 担体柱子的 Gc/MS 来分析 HPLC 的过渡馏份 (γ_1 , γ_2) 及氧化馏份 (σ)。Dexsi/300 柱以每分钟 $6^\circ C$ 柱的速度,从 $80^\circ C$ 程序升温到 $350^\circ C$, SP2250 以每分钟 $4^\circ C$ 的速度,从 $80^\circ C$ 程序升温至 $320^\circ C$ 。

油烟尘萃取物致突变活性的灵敏度高, 选作实验用菌株。

结果和讨论

HPLC分离

开管柱液体色谱分离方法已广泛地得到使用, 该方法按照化学功能可将复杂的环境尘埃进行分离。由于用 HPLC 直接分离飘尘萃取物的方法具有重现性及快速的优点, 近来已开始得到普及。已报导了用 HPLC 分离柴油烟尘萃取物的情况, 与“实验部分”所说的低分离度 HPLC 分析情况相似。图1表示了用这个方法对 NI-1 和 OL-1 柴油烟尘萃取物进行分析, 用荧光检测器所作的洗脱图。萃取物中, 中性的组份被分离为非极性的 PAH (α_1 , α_2 , β), 中等极性的过渡馏份 (γ_1 , γ_2) 以及极性的次馏份氧化物 σ_1 和 σ_2 在图中未表示出来)。

柴油机烟尘萃取物也得到了相似性质的色谱图。但是, NI-1 的 α_2 , β 和 γ_2 的峰比 OL-1 的峰高。发现大气飘尘萃取液的 HPLC 分析也具有性质相似的色谱图^(32,41)。

从 HPLC 柱洗脱的每一馏分的收集时间见图1。表 II 给出了每一馏分中洗脱物的百分比。利用这个程序, 由 HPLC 分析的物质回收率接近 100%。

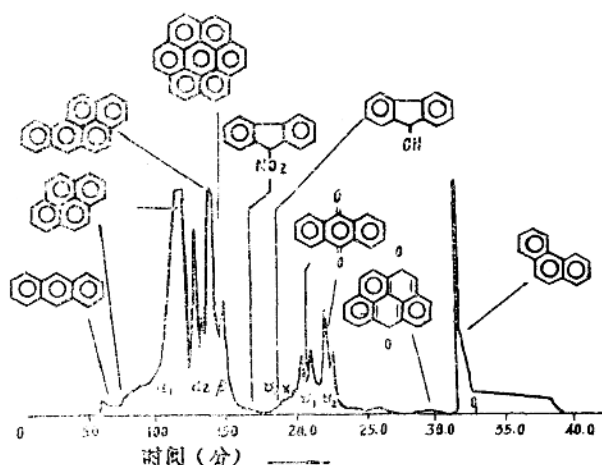


图2 用 RCM 高分辨正相硅胶柱 (径向-PAKB) 对柴油烟尘萃取物 (NI-1) 进行 HPLC 分离所得馏份和一些标准物的色谱图。荧光检测器 $\lambda_{ex} = 313\text{nm}$, $\lambda_{em} = 418\text{nm}$ 。

在本工作中, 低分离度的 HPLC 技术有所改进, 使得馏分分离度提高。图2是用“实验部分”所说的高分离度的 RCM 柱对柴油烟尘萃取物 NI-1 的 HPLC 分离情况。两个馏分之间的基线分离有了很大改进, 这样, 允许收集过渡馏分而不受 PAH 馏分的干扰。几个标准品的洗脱时间见表 III。由于尘埃萃取物中有大量的化合物, 而 HPLC 的分离度有限, 所以欲测定这些馏分的详细化学组成, 则要求利用光谱学的技术, 例如质谱。但是, 尽管如此, 还是采用 HPLC 洗脱标准品的方法来确定可能存在于每一馏分中的化合物的类别。在 α_1 , α_2 馏分中, 分别洗脱出 2—4 环的 PAH 和 4—6 环的 PAH。在 β 区间洗脱出 6—8 环的羟基苯和 2 环的 PAH 硝基物。在 γ 、 σ 区间洗脱出 2—6 环的 PAH 硝基物, 3—4 环的羟基 PAH, 3—4

环甲基醛类, 3环的 PAH 醌类和3—5环的 PAH 酮类。在 γ_2 区间洗脱出3—5环 PAH 醌类, 5—7环羟基 PAH , 3—4环 PAH 酮类, 3—5环二羟基 PAH 和3环二硝基 PAH 。6环以上的醌类化合物, 3环以上的 PAH 甲酸化合物和含氮杂环化合物在 σ_1 馏分中洗脱。

由图2可见, $HPLC$ 方法的一个优点是在 $(\alpha_1, \alpha_2, \beta)$, (γ_1, γ_2) 和 σ 区域之间有很好的基线分离。如果 $(\alpha_1, \alpha_2, \beta)$ 和 (γ_1, γ_2) 之间的基线分离不好, 将造成 (γ_1, γ_2) 区域的样品被脂肪烃类和 PAH 化合物污染, 从而给分析带来困难。

表II 柴油烟尘的两个萃取物中, 各种 $HPLC$ 馏份的Ames致变活性 (TA98) 荧光响应和质量

HPLC(馏份)	NI—1 样 品 ^a						OL—1 样 品 ^a					
	Ames 活 性 ^b				质量重量 %	荧光响应 (%)	Ames 活 性 ^b				质量重量 %	荧光响应 (%)
	绝 对 活 性 (An)		百分比活性 (Rn)				绝对活性 (An)		百分比活性 (Rn)			
	—Sg	+Sg	—Sg	+Sg			—Sg	+Sg	—Sg	+Sg		
α_1	<50	—	<1	20	57.4	10.4	<25	250	<2	16	53.0	22.2
α_2						20.4						6.1
β	87,500 (<3,000)	—	24 (<1) ^c	21	1.3	5.8	2,000	4,800	5	10	1.7	2.2
γ_1	38,800	—	43	24	4.3	20.2	6,100	3,500	64	33	6.9	25.3
γ_2	23,800	—	15	13	5.0	23.6	2,500	4,500	9	13	2.3	18.3
σ_1	7,200	—	17	22	16.0	19.6	890	850	23	19	16.1	25.9
σ_2	—	—	—	—	14.7	—	—	—	—	—	16.5	—
总馏份	—	—	—	—	98.7	100.0	655	721	103	91	96.5	100.0
总萃取物	12,500	—	—	—	100.0	—	630	790	100	100	100.0	—

a、见图1 HPLC色谱图

b、绝对Ames活性单位是回变菌落数/mg。

c、括号中出现的值是在从 σ_1 馏份中仔细地分离出 β 馏份在硝基苯被洗脱前切割 β 馏份)并在收集样品24小时内分析所得出的突变值。

d、1—硝基萘的“回变菌落数/mg”大约为150,000。

在低分离度和高分离度的 $HPLC$ 色谱图之间有几处明显的区别。大约在低分离度谱图(图1)的 α_2 和 γ_1 峰之间, 以及在高分离度的 α_2 峰右侧(图2)洗脱出一个 β 峰。将 β 峰的一个次馏分(B^*9)从低分离柱子收集来进样到高分离柱内, 结果该物质在图2的 β 域区内于14.2分洗脱下来, 说明由两个不同的 $HPLC$ 程序洗脱下来的两个 β 峰含有相同的化学成分。本报告给出的数据将说明, β 峰主要由大分子量的 PAH 和烷基取代的 PAH 组成。

表Ⅲ 利用HPLC的高分离度RCM正相硅胶^a测得的一些PAH和PAH衍生物的保留时间

化 合 物 名 称	分 子 量	保 留 时 间 ^b (分钟)	
		紫 外	萤 光
α_1 、 α_2 馏份 (0—13.5分)			
萘	128.063	4.3	—
蒽	178.078	6.6	—
苈	202.078	6.7	6.8
萤蒽	202.078	8.1	—
(夹) 氧杂蒽	182.073	9.5	—
苯并 (a) 苈	252.094	12.3	—
苯并 (e) 苈	252.094	12.4	12.3
苈	252.094	12.5	—
1,2-苯并 (k) 萤蒽	252.094	12.6	—
苯并 (g, h, i) 苈	276.094	12.7	12.6
蒽	228.094	12.9	12.9
β 馏份 (13.3~17.0分)			
羧苈	300.094	13.7	13.7
β -19峰 (见图2)		14.2	—
1,2,4,5,二苯并苈	302.109	14.4	14.5
1,2,3,4,二苯并蒽	278.109	14.5	—
羟基苯甲醇	124.052	15.0	14.8
α -硝基苈	211.063	17.0	17.0
λ_1 馏份 (17.0~21.5分)			
2-硝基萘	173.048	7.5	—
9-羟基苈	182.073	—	13.3
1-硝基苈	247.063	19.5	—
6-硝基苯并 (a) 苈	297.019	20.4	—
2-羟基 9-苈酮	196.052	20.4	20.4
7-苯并 (a) 苈甲醛	256.089	20.7	20.7
9-苈甲醛	206.073	20.7	20.7
9-苈酮	180.057	21.0	21.0
1-苈甲醛	230.073	21.7	21.7
λ_2 馏份 (21.5~25.0分)			
9, 10苈酮	208.052	22.0	—
2, 7 二硝基苈	256.048	22.4	—
3, 8 苈酮	232.052	22.5	23.0
5, 6 羟基	258.068	24.2	—
羟基苯并 (a) 苈	268.089	24.4	24.7
9-苈酮	194.073	25.3	—
λ_3 馏份 (25.5~30.5分)			
1,6苯并苈酮	282.098	28.4	—
9-(夹) 氧杂苈酮	198.068	19.1	—
7-苯并苈酮	244.089	30.1	—
σ_1 馏份 (30.5~40.0分)			
夹氮蒽	179.073	31.7	31.6
苯并 (e) 喹啉	180.069	31.9	31.8
7-苯并苈甲酸	272.079	30—32	—
5,6-苯并喹啉	179.073	32.0	02.0

a、馏份的命名见图2。rlx馏份从16.8—20.0分被洗脱。Biosil用柱所得的相似馏份，其命名见图1。

b、保留时间的准确度在0.5分之内。检测器是串联的。

致突变性试验

在“实验部分”已谈到用由HPLC技术收集来的馏分进行致突变活性实验。表II给出实验结果。遗憾的是没有测定用于Ames试验的NI-1样品的量。然而，每一馏分的致活性的百分比(R_n)可用等式1进行测定计算。

$$R_n = \frac{(A_n)(V_n)}{\sum_{n=1}^{n=x} (A_n)(V_n)} \times 100 \quad (1)$$

式中：

A_n = 每一馏分的致变活性，以“回变菌落数/mg”为单位。

V_n = 收集的馏分n的总体积(μ l)。

x = 馏分的总数。

每一馏分的致变活性(A_n)用回变菌落数/mg为单位由等式2进行计算。在计算中，假设总萃取物的致变活性与各馏分致变活性的总和相等。(该假设与OL-1样品是相符的)。

$$A_n = \frac{(A_T)(R_n)(M_n)}{\sum_{n=1}^{n=x} (R_n)(M_n)} \quad (2)$$

式中：

A_T = 总萃取物的致变活性(回变菌落数/mg)。

K_n = 由等式1计算得来的馏分n表现的致变活性百分比。

M_n = 馏分n的质量(mg)

x = 馏分的总数。

对样品OL-1的各个馏分的致变活性(A_n)及总萃取物的致变活性(A_T)进行了初步测定。从这些结果可见，由HPLC得到的Ames活性的百分回收率(A_{HPLC})可用等式3进行计算。

$$A_{HPLC} = \frac{\sum_{n=1}^{n=x} A_n(M_n/M_T)}{A_T} \times 100 \quad (3)$$

式中：

A_n = 致变活性(回变菌落数/mg)。

M_n = 由HPLC收集到的馏分n的量(mg)。

M_T = HPLC进样的总萃取物的量(mg)。

A_T = 总萃取物的致变活性(回变菌落数/mg)

利用这一等式，可以算出由HPLC能获得103%的直接致变活性和91%的接致变活性的回收率。

未测出 α_2 馏分的致变活性,大约占总致变活性的10%以下,因为其它馏分计算出的致变活性是总萃取物致变活性的90%强。

如果能进行一个简单的HPLC的荧光测量,将是很有价值的,过去已有人进行了这方面的研究有限的结果表明两个参数之间有很好的相关关系⁽²⁰⁾。把相同量的每种萃取物进样于HPLC中(30 μ g),总和每一馏分的荧光响应,并计算出各个馏分荧光强度所占的百分比,列于表2。在这两个样品的HPLC荧光色谱图之间,最显著的差别是 α_2 峰和 β 峰的相对高度(图1)。因此荧光强度的增加—正如这两个HPLC组分显示的那样—与观察到的致变活性的增加可能是有关系的。然而,由表II可见,所有的NI-1样品馏分比看到的OL-1样品的馏分的绝对活性要高。因此,这里没有表现出这两个样品的荧光强度与致变活性之间的相互关系。

对于NI-1和OL-1萃取物中的 α_1 、 α_2 馏分,其致变活性小于总萃取物未经Sq激活的致变活性的1—2%,这说明其中直接致变物的浓度很低。由间接作用的致变活性(16—20)可以估量到,事实上这些馏分的85%—90%是由非致变的脂肪族碳氢化合物、烷基苯和烷基萘组成的。

样品NI-1的 β 馏分的间接致变活性比任何其它馏分都高(87,500回变菌落数/mg)(表II)。还发现(表III)致突变物质如硝基苯和硝基萘的洗脱位置非常靠近 β 和 γ_1 馏分分离点,在此点,收集 β 和 γ_1 馏分作为生物和化学试验用。因此,要注意保证在这些物质洗脱出来之前首先切割 β 馏分。另外,本报告已证明, β 馏分中存在的化学物质在被HPLC分离之后的存贮期间很容易发生氧化作用。因此,分离 β 馏分时,必须很仔细,而且必须在收集到 β 馏分的24小时内进行生物实验。在这种情况下,没有检出 β 馏分的直接致变活性(<3,000回变菌落数/mg)。用相同的方式分析测定样品OL-1的 β 馏分,其直接致变活性为2,000回变菌落数。在 β 馏分的生物实验中遇到了一个问题,即能用于生物实验的馏分收集物太少。因此,为了获得足够的收集物,需利用大型的HPLC柱,而这样,分离度就较低,因而很难保证在收集 β 馏分时不被一部分PAH消基物污染。

与任何馏分相比, β 馏分的间接致变活性是最高的,而 γ_1 和 γ_2 馏分所表现出的直接致变活性高于50%,因此选择这三个馏来进行详细的化学分析。

质谱分析

采用直接进样的HRMS和GC/MS,可分析柴油提取物中每一个HPLC的馏份。如前所述,无论在低分辨率或高分辨率的仪器上,均可得到高准确度的数据⁽¹⁾。

直接进样技术,在分析那些对气相色谱不稳定的或极性较高的化合物时很方便。另外,高分辨的质谱还可提供出准确的分子式,以帮助证实GC/MS的鉴定。

至少需要12,000的分辨率(10%谷)才能恰当地分辨出各种质量碎片。例如,在标称质量208处,可能是两个PAH氧化物分子式: $C_{14}H_8O_2$ (m/z 208.052)和 $C_{15}H_{12}OC$ (m/z 208.0872)。而具有 $C_{14}H_8O_2$ 分子式的PAH氧化物就包括了(蒽,菲的)醌,二酮醛以及环戊酮酮萘醛类。具有 $C_{15}H_{12}O$ 结构的PAH氧化物包括了甲基(蒽酮,菲酮),二甲基萘酮,甲基萘醛,二甲基环戊萘并酮类以及甲基羟基(蒽和菲)。一共有200种以上这些物质的异构体,而要准确地鉴别这些化合物几乎是不可能的。每一种化合物都给出了独特的谱图,可用来区分它们的类别。

把直接进样的质谱所得的数据与气相色谱分析所得的数据进行比较,用GC/MS鉴别组份的时候,每个组份的相对丰度是以与丰度最大的组份相比而确定的。(这些组份有, γ_1 γ_2

馏份中的9-蒽酮和蒽二酸酐)。直接进样的HRMS分析也采用了相同的方法。如果在GS/MS程序中,存在着一些没有洗脱及分离的化合物,那么用HRMS和GC/MS所得出特殊物质的相对丰度差将是正值。假如从GC/MS洗脱的物质比从HRMS中流出的碎片所代表的物质多,则丰度差将是负的。到目前为至,尚未遇到过明显的负差。一个由HRMS和GC/MS两种方法得出的相等的相对丰度值说明了在GC/MS分析中对所有可能存在的化合物都用特别精密的质量数进行了计算。

对于每个化合物的三至四个最强离子,已提出了高精度度($\pm 0.003 \text{ AMU}$)或一般精确度($\pm 0.1 \text{ AMU}$)的精确质量色谱。每一种氧化的或硝化的PAH衍生物,都常常有许多异构物。例如,甲基(菲或蒽)醛可能有72种异构物。而许多具有较高分子量的PAH衍生物则异构物更多,因此要作出全部的鉴定几乎是不可能的。为了测定所存在的化学组成,研究了许多标准化化合物的质谱,一系列被取代的PAH异构体常常会给出相似的质谱图,但这只能用来确定化合物所存在的类别。

这篇论文中所列的各种化学分析数据,都是对样品OL-1而言的,但 β 馏份的分析数据除外, β 馏份是由样品NI-1衍生而来的。

α_1, α_2 馏份的分析

样品OL-1中的脂肪烃类被选择性地除去,并用“实验部份”所说的毛细管柱进行GC/MS分析。表IV给出了这些馏份中鉴定出的PAH物质的相对丰度。被鉴定的PAH的MW范围由173到302。甲基化的PAH是丰度最大的PAH物质。为了比较PAH与PAH衍生物的相对丰度,取得了这个馏份的数据。这个馏份的组成与以前许多其它研究测定的结果是一致的(6,29,30,36,48)。

β 馏份的分析

如“实验部份”所说,利用一支反相柱将NI-1样品中的 β 馏份分离为三十个次馏份。选择M-1萃取物中的 β 馏份是因为这个样品与所得许多其它烟尘萃取物相比,具有一个非常高的HPLC荧光峰。

基于对24-30*馏份(图3)中的相对定量和对其它馏份的定性基础上,利用直接进样的HRMS来鉴定组成。先洗脱出来的馏份(1-10*)可能含一些PAH的硝基物。然而,(如果存在的话)它们应该在收集第一馏份前就已经被洗脱出来了。因为用反相HPLC柱分离时,极性较大的物质首先被洗脱。在24-30*馏份中,定性了的化合物以及它们在各馏份中的相对丰度列于表5,参见图3。在这个馏份中丰度最大的化合物是质量为300.094($\text{C}_{24}\text{H}_{12}$)的化合物,其质谱图5晕苯极其相似。环戊烯并二苯并芘也有一个300.094的分子量。但是能通过M-1和M-2相对于母离子的相对丰度($\approx 40\%$)来与晕苯区分开。两个来自晕苯的离子丰度小于10%(相对于M⁺)。

如图3所示,根据24-30*馏份的($\text{C}_{24}\text{H}_{14}$)⁺离子的相对丰度的变化,分子量为302.106的化合物可能有两个,这二物质已被确定为两个二苯并芘的同分异构体。

质量为290.109($\text{C}_{23}\text{H}_{14}$)的主要组份初步确定为甲基蒽并蒽或异构体。还已经鉴定出环戊晕苯或环戊烯并二苯并芘($\text{C}_{23}\text{H}_{14}$)以及蒽并蒽或异构体($\text{C}_{22}\text{H}_{12}$)。另外还发现一个相对浓度较低的羟基晕苯,但我们认为这个物质大概是在分析过程中或贮存过程中形成的,因为羟基晕苯在HPLC分离过程中,不可能洗脱于这个馏份。(见表III)

表IV 用GC/MS (25米Dexsil300毛细管柱) 和HRMS对柴油烟尘萃取物 (ol-1) 中的HPLC的PAH (α_1 , α_2) 馏份进行鉴定所得的各种 PAH相对丰度值。

化 合 物	分 子 式	分 子 量 ^a	相对丰度 ^b
菲和蒽	$C_{14}H_{10}$	178.078	0.27
甲基 (菲和蒽)	$C_{15}H_{12}$	192.094	0.54
萤蒽	$C_{16}H_{10}$	202.078	0.41
芘	$C_{16}H_{10}$	202.078	0.41
二氢 (萤蒽和芘)	$C_{16}H_{12}$	204.094	0.09
二甲基 (菲和蒽)	$C_{16}H_{14}$	206.110	1.00
苯并芴	$C_{17}H_{12}$	216.094	0.67
甲基 (萤蒽和芘)	$C_{17}H_{12}$	216.094	0.55
苯甲基萘	$C_{17}H_{14}$	218.110	0.18
二甲基 (菲或蒽)	$C_{17}H_{16}$	220.126	0.37
环戊烷并芘	$C_{18}H_{10}$	226.078	0.47
苯并 (a) 蒽 (BaA), 蒽和苯稠 (9,10) 菲	$C_{18}H_{12}$	228.094	0.16
二苯基苯	$C_{18}H_{14}$	230.110	0.11
甲基 (CBaA) 蒽和苯稠 (9,10) 菲	$C_{18}H_{14}$	242.110	0.42
苯并萤蒽	$C_{20}H_{12}$	252.094	0.33
苯并 (e) 芘 (BeP), 苯并 (a) 芘 (BaP) 和芘	$C_{20}H_{12}$	252.094	0.48
甲基苯并萤蒽	$C_{21}H_{14}$	266.110	0.13
甲基 (BeP, BaP, 芘)	$C_{21}H_{14}$	266.110	0.16
苯并 (g,h,i) 芘和蒽并蒽	$C_{22}H_{12}$	276.094	0.25
星苯	$C_{24}H_{12}$	300.094	0.06
二苯并芘	$C_{24}H_{14}$	302.110	0.02

a 分辨率12K时, 测量值准确度在 ± 10 PPM之内。

b 相对丰度指对二甲基 (菲或蒽) 而言。

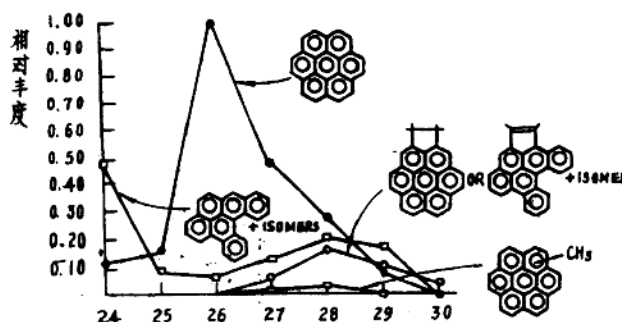


图3 用高分辨质谱对样品NI-1中 β HPLC馏份的24—30*进行鉴定所得PAH的相对丰度值

在1—23*馏份中含有PAH物质 (MW 206—276)。有时, 还有一些PAH的氧化产物。这些PAH的氧化衍生物可能是在贮存和分析过程中形成的, 因为它们在 β 馏份中是不会被洗脱出来的。(见表III) 各个PAH对于氧化作用的灵敏性能通过比较PAH氧化物及其PAH母体的丰度来评定。基于这一假设, 苯并 (a) 蒽 (或异构体) 是1—14*馏份中最易氧化

的物质之一。在所选择的馏份中丰度最大的物质如下:

- *3 一二甲基(蒽或菲)
- *5 一环戊茈
- *8 一二联苯
- *9 一苯并(a)蒽 + 异构体
- *11 一甲基二联苯
- *12 一甲基苯并(a)蒽
- *14 一二羟基(苯并(a)茈 + 异构体)

γ_1 , γ_2 馏份的分析

图4a, 4b和图5分别为用GC/MS分析 γ_1 和 γ_2 馏份时, 经计算机重排的总离子流色谱图(OL-1样品). γ_1 和 γ_2 馏份中分析鉴定出的化合物列于表VI、表VII和表VIII、表IX中, 表VII和IX列出了用直接进样的HRMS和GC/MS鉴定PAH碎片的相对丰度比较值。

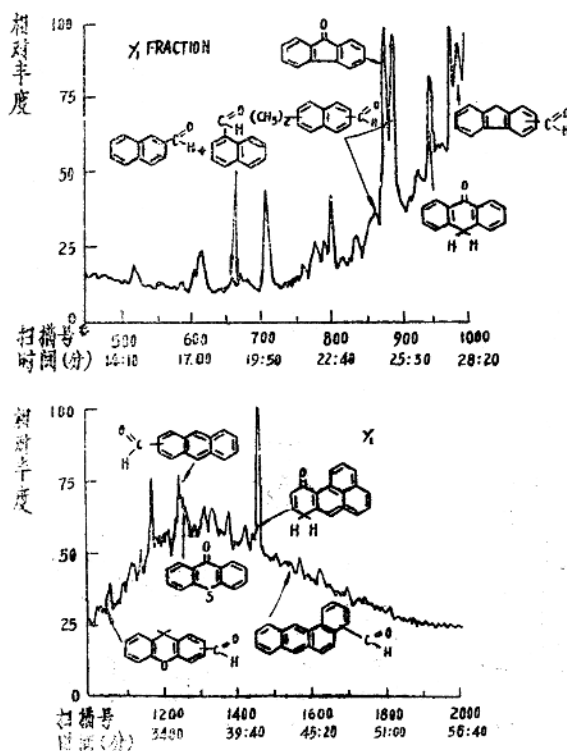
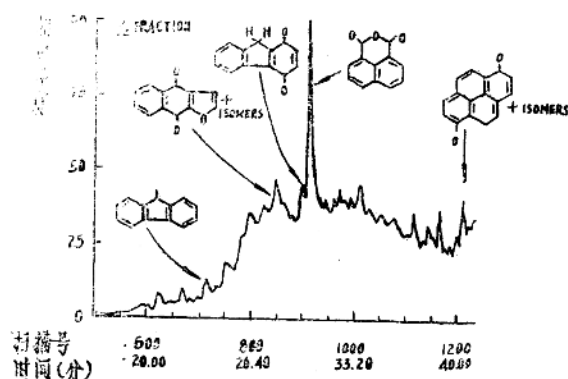


图4用6英尺SP2250柱对柴油烟尘萃取物OL-1进行HPLC分离, 其中 γ_1 馏份再用GC/MS分析鉴定所得的总离子质谱图

在 γ_1 和 γ_2 馏份中, 发现9-芴酮和蒽醌是最多的化合物。用母离子和两个最强丰度碎片的总离子流强度计算出其它碎片的相对丰度。每一类型的PAH衍生物(如酮醌)的相对丰度可以从表IV到IX所列的数据中查得。对于这些数值, 在“摘要和结论部分”已作了讨论。

表V 柴油烟尘萃取物 (NI-1) 中的 β HPLC 馏份的化学组成

化 合 物	分 子 量		相 对 丰 度 (馏 份 号)						
	实 测	理 论	24	25	26	27	28	29	30
蒽或异构物 ($C_{22}H_{12}$)	276.097	276.094	0.181	0.009	—	—	—	—	—
甲基蒽或异构物 ($C_{23}H_{14}$)	290.108	290.109	0.382	0.269	—	—	—	—	—
晕苯 ($C_{24}H_{12}$)	300.092	300.094	0.121	0.159	1.000	0.480	0.293	0.073	—
二苯并芘 ($C_{24}H_{14}$) -2异构物	302.106	302.103	0.481	0.097	0.068	0.123	0.202	0.174	—
甲基晕苯 ($C_{25}H_{14}$)	314.091	314.109	—	—	—	0.010	0.028	—	—
羟基晕苯 ($C_{24}H_{12}O$)	316.091	316.089	0.034	0.042	0.049	0.051	0.032	—	—
环戊烷并苯基或 环戊烯并二苯并芘 ($C_{26}H_{14}$)	326.111	326.110	—	—	—	0.053	0.162	0.109	0.043

图5用6英尺 $De \times sil300$ 柱对柴油烟尘萃取物LO-1进行HPLC分离, 其中 γ_2 馏份再用GC/MS分析鉴定所得的总离子质谱图

当用总离子丰度来计算时, 发现这两个馏分中大约有60%重量的物质被氧化成PAH衍生物。在这些馏份中发现, 仅有的杂环化合物是一些硫杂蒽和氧杂蒽的氧化产物。 γ_1 和 γ_2 馏份中的残留物几乎均由脂肪烃和酞酸酯所组成。这部分污染物来源于高效液相色谱切割馏份和浓缩溶剂的过程, 包括溶剂, 进样器隔膜以及正相柱的流失等各方面。目前已鉴定的PAH衍生物有: 羟基酮, 醛, 醌, 二羟基, 酸酐和硝基衍生物等。这些化合物的详细质谱分析情况将在下一部分谈到。目前, 正在准备出版一篇包括100多种PAH的氧化物和硝基化的标准化合物的谱图解析资料⁽⁴⁹⁾。