**DOI**：10.19789/j.1004-9398.2023.02.007
**文献引用**：褚琳琳，吕晓昊，耿冬梅，等. SPE-HPLC双检测器法同时测定地表水中的苯并[a]芘和阿特拉津含量及不确定度评定[J]. 首都师范大学学报（自然科学版），2023，44（2）：35-42. CHU L L，LYU X H，GENG D M，et al. Simultaneous determination of Benzo[a]pyrene and Atrazine in surface water by SPE-HPLC dual detector and evaluation of uncertainty[J]. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2023，44（2）：35-42.

# SPE-HPLC双检测器法同时测定地表水中的苯并[a]芘和阿特拉津含量及不确定度评定*

褚琳琳**，吕晓昊，耿冬梅，张　然，孔翠羽
（山东省威海生态环境监测中心，山东 威海　264200）

**摘要**：采用全自动固相萃取（SPE）-高效液相色谱（HPLC）双检测器法同时定量分析地表水中的苯并[a]芘（BaP）和阿特拉津（AT）含量，建立了BaP和AT含量不确定度的分析方法。从样品前处理过程、样品重复测定、标准溶液配制和标准曲线拟合等方面评定了不确定度分量的贡献。评定结果显示：在影响检测结果的4个分量中，HPLC测定地表水中BaP含量时，标准曲线拟合和样品前处理过程引入的不确定度对结果影响较大，当BaP质量浓度为2.01 ng/L时，其扩展不确定度（$U$）为0.24 ng/L（$k$=2）；测定AT含量时，标准溶液配制和样品重复测定引入的不确定度对结果影响较大，当AT质量浓度为50.09 ng/L时，$U$=4.72 ng/L（$k$=2）。

**关键词**：不确定度评定；苯并[a]芘；阿特拉津；固相萃取；高效液相色谱法
**中图分类号**：O657.7；P207　　**文献标识码**：A

# Simultaneous determination of Benzo[a]pyrene and Atrazine in surface water by SPE-HPLC dual detector and evaluation of uncertainty*

CHU Linlin**，LYU Xiaohao，GENG Dongmei，ZHANG Ran，KONG Cuiyu
（Shandong Weihai Eco-Environment Monitoring Center，Weihai Shandong　264200）

**Abstract**：A method for the determination of Benzo[a]pyrene and Atrazine in surface water by automatic solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with double detector was developed. The contribution of uncertainty component was evaluated from four aspects：sample pretreatment process，sample repeatability determination，standard solution preparation and standard curve fitting. Among the four uncertainty components，the uncertainty introduced by standard curve fitting and sample pretreatment process has a great influence on the determination of Benzo[a]pyrene content. When the content of Benzo[a]pyrene in surface water was 2.01 ng/L，the extended uncertainty was 0.24 ng/L（$k$=2）. In the determination of Atrazine content，the uncertainty introduced by standard solution preparation and sample repeatability determination has great influence on the results. When

收稿日期：2022-04-23
* 江西省教育厅科学技术研究项目青年项目（GJJ190613）；山东省高等学校优秀青年创新团队项目（2019KJM008）
** 通信作者：linlinchu@yeah.net

Atrazine content was 50.09 ng/L, the extended uncertainty was 4.72 ng/L($k$=2).

**Keywords**: evaluation of uncertainty; Benzo [a] pyrene; Atrazine; solid phase extraction; high-performance liquid chromatography

**CLC**: O657.7; P207 **DC**: A

## 0 引 言

苯并[a]芘(1,2-Benzypyrene,BaP)是具有五环的多环芳香烃(polycyclic aromatic hydrocarbons,PAHs)结构,化学性质稳定,难以被分解或转化,能积累在生物体中,导致生物染色体发生畸变,具有潜在的致畸和致突变作用[1]。BaP在环境介质中经久不衰,存在时间最长可达数十年,严重威胁人体健康[2]。阿特拉津(Atrazine,AT)具有三嗪结构,分子结构稳定,强水溶性,是一种常见的农作物广谱除草剂[3],施用过程中仅小部分被植物吸收,其余随地球表面循环进入土壤、径流和地下水等生态系统中。在自然界中被微生物矿化的过程非常缓慢,易对环境及生物个体造成不良影响[4]。

传统的检测BaP和AT的主要方法有气相色谱-质谱联用法(gas chromatograph-mass spectrometer,GC-MS)[5-6]和液相色谱法(liquid chromatography,LC)[7-8]。GC-MS以气体为流动相,借助色谱柱分离低沸点和易挥发(<500 ℃)样品,然后利用质谱(mass spectrometer,MS)实现有机物的定性和定量分析。其既保留了GC的高分离性能,又具有MS的结构鉴定功能,具有灵敏度高、抗干扰能力强和检测范围广的优势,在环境监测、食品安全等领域具有广泛的应用前景[9]。LC是指流动相为液体的色谱技术,借助于样品中各组分分子在流动相和固定相之间作用力的差别而进行高沸点、大分子、强极性和热稳定性差化合物的分离,在LC基础上,高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography,HPLC)采用高压泵、高效固定相和高灵敏度的检测器可实现快速、高效和高灵敏地分析样品,检测器包括:紫外、二极管阵列、示差折光、荧光和电化学检测器等,其中,紫外、荧光和电化学检测器为选择性检测器,其响应值不仅与试样溶液的浓度有关,还与化合物的结构有关;示差折光检测器为通用型检测器,对所有的化合物均有响应[10-11]。与GC-MS仪器相比,HPLC仪器的普及度更高,因此本文主要选取HPLC仪器完成样品的检测。

检测BaP和AT的前处理方法主要有液液萃取法(liquid-liquid extraction,LLE)和固相萃取法(solid-phase extraction,SPE)2种。在众多的样品前处理技术中,LLE是使用最广泛的方法之一。其原理是利用化合物在2种互不相溶(或微溶)溶剂中的溶解度或分配系数不同,使某一化合物从一种溶剂部分地分配到另一溶剂中,经过若干次萃取,把绝大部分该化合物提取出来[12]。LLE法具有使用简单、无需昂贵仪器的优点,但是存在回收率低、耗费萃取剂、操作繁琐、耗时长和溶液易乳化等缺点[13-14]。SPE是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物吸附,与样品的基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱,达到分离和富集目标化合物的目的。与LLE法相比,SPE具有消耗有机溶剂少、自动化程度高、操作误差小和无乳化现象等优点[14]。本文拟使用自动化的SPE仪进行样品前处理。

现有文献多是对样品前处理及分析方法进行了考察,从化学分析中的不确定度评定的角度研究较少。不确定度是衡量实验数据准确程度,评价结果可行性、可比性、可信度的重要参数。在化学分析过程中,特别是对于痕量物质的分析发挥着非常重要的作用。1993年,国际标准化组织(International Organization for Standardization,ISO)与国际计量局(Bureau International des Poides et Measures,BIPM)等机构出版了*Guide to the expression of uncertainty in measurement*[15],对应中文名称为《测量不确定度表示指南》,正式确定了适用于广泛测量领域的评估和表达测量不确定的通用原则;2005年,国家市场监督管理总局发布了《化学分析测量不确定度评定:JJF 1135—2005》[16],规范了化学分析测量不确定度的评定及表示方法;2012年,国家市场监督管理总局发布了《测量不确定度评定与表示:JJF 1059.1—2012》[17],为测量结果的比对提供了国际上公认一致的依据。测量不确定度是与测量结果相联系的参数,表示合理的赋予被测量之值的分散性[18]。通过测定不确定度的来源和不确定度分量之间的贡献,可以采取相应改进措施,对降低测量误差、提高实验数据的准确度具有重要意义。Evangelia等[5]以SPE法进行前处理,使用GC-MS测

量地表水中BaP和AT的相对扩展不确定度($U_{rel}$)分别为8.0%和24.2%;Tatjana等[19]研究表明HPLC测定成品油中芳香族物质时,测量重复性的不确定度贡献较高,原因是测量重复性包括从样品制备、校准到最终结果计算的整个测量过程;Chen等[20]使用HPLC测定了食品中诱惑红的含量并进行了不确定度评定,通过计算得出,标准工作溶液的制备过程引入的不确定度占86.2%,是不确定度的主要来源,但该文献未进行标准曲线拟合的不确定度分析;冯静等[21]使用HPLC测定了地下水中的BaP含量并进行了不确定度评定,其忽略了样品前处理过程的评定,且未对AT进行测量及评定。以上研究表明GC-MS法测量AT得到的$U_{rel}$较高。目前,测量BaP和AT最普遍、应用最广泛的方法是HPLC法,但同时定量分析地表水中的BaP和AT,且对二者进行不确定度评定的文献较少。

现行环境标准《水质阿特拉津的测定高效液相色谱法:HJ 587—2010》[22]《水质多环芳烃的测定液液萃取和固相萃取高效液相色谱法:HJ 478—2009》[23]《生活饮用水标准检验方法农药指标:GB/T 5750.9—2006》[24]及《水质阿特拉津的测定固相萃取-高效液相色谱法:SL 761—2018》[25]采用不同的前处理及色谱条件对BaP和AT进行测试,前人研究也多以BaP或AT单因子为测试对象。而根据《地表水环境质量标准:GB 3838—2002》[26],BaP和AT均为集中式生活饮用水地表水源地特定项目,生态环境监测方案规定每月需对2种污染物进行1次例行监测,监测频次较高。本文拟建立全自动SPE-HPLC双检测器法(检测器包含荧光检测器及紫外检测器),对地表水中的BaP和AT同时进行测定,降低样品前处理的复杂度、缩短检测周期,并合理评定测量二者的不确定度,以为环境样品监测BaP和AT含量提供高效、快捷的检测方法和理论依据。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料与试剂

色谱纯甲醇($CH_3OH$,产品编号为34860,纯度≥99.9%)和二氯甲烷($CH_2Cl_2$,产品编号为34856,纯度≥99.8%)均购自德国默克(MERCK)有限公司;优级纯氯化钠(NaCl,含量≥99.8%)购自科密欧化学试剂有限公司;高纯氮气($N_2$,纯度≥9 999.9‰)购自威海市新月化玻仪器有限公司;AT甲醇溶液标准物质(有证标准物质编号:BWN5191—2016,质量浓度为100.00 mg/L,$U_{rel}$=4.0%($k$=2))购自北京北方伟业计量技术研究院;BaP甲醇标准物质(有证标准物质编号为GBW(E)082505,质量浓度为100.00 mg/L,$U_{rel}$=3.0%($k$=2))购自国家标准物质认证中心。实验用水皆为超纯水。

### 1.2　仪器与设备

采用日本岛津公司生产的LC-20A型HPLC仪进行样品分析,配SPD-20A型紫外可见双波长检测器,用于检测AT,检测器以氘灯为光源,波长为190~700 nm,波长准确度<1 nm;配型号为RF-20A的荧光检测器,用于检测BaP,激发和发射波长($\lambda_{ex}$和$\lambda_{em}$)均为200~900 nm;配SIL-20A型自动进样器,进样方式为全量进样,进样量为100 nL~100 μL;配LC-20AT型液相系统泵,100 μL双柱塞串联标准分析泵;配日本GL Sciences公司C18液相色谱柱(产品编号:5020-02746),柱尺寸为4.6 mm×250.0 mm,填料粒径为5 μm。采用力德科技公司生产的ATR Super SPE 300全自动固相萃取仪进行样品前处理,配赛默飞世尔科技公司(中国)生产的C18固相萃取柱(货号:074412),萃取柱体积为3 mL,填料质量为500 mg。使用美国Millipore公司生产的Q-POD型Milli-Q纯水机过滤实验用水,超纯水电阻为18.2 Ω。

### 1.3　样品前处理

(1)使用10 mL $CH_2Cl_2$预洗C18的SPE柱,待预洗剂流净之后,依次用10 mL $CH_3OH$、10 mL超纯水分别活化柱子2次,活化过程中保持SPE柱湿润;(2)量取1 L威海市高格河地表水样,分别加入5 g已400 ℃烘干2 h的NaCl和10 mL $CH_3OH$,超声10 min混匀,以10.0 mL/min的流速上样;(3)富集完毕后,使用高纯$N_2$吹扫20 min,干燥SPE柱;(4)用5 mL $CH_2Cl_2$浸泡SPE柱5 min,再用$CH_2Cl_2$以2.0 mL/min的洗脱速度洗脱2次,收集洗脱液;(5)将SPE仪程序设置为"浓缩"模式,调节温度为35 ℃,低流速下用$N_2$将洗脱液吹至近干,加入5 mL $CH_3OH$继续$N_2$吹至近干,转移溶液并定容至500 μL待测。空白实验,以超纯水代替实际样品重复上述实验。

### 1.4　标准溶液配制

在10 mL的容量瓶中加入200 μL BaP标准溶液,$CH_3OH$定容,得到质量浓度为2.00 mg/L BaP二级标准溶液;分别用移液器移取1 mL BaP二级标准溶液和AT标准溶液于10 mL容量瓶中,$CH_3OH$定容,得到BaP和AT质量浓度分别为200.00 μg/L和10.00 mg/L的混合标准溶液1;分别移取1 000、500、

250和100 μL上述混合标准溶液1置于4支10 mL容量瓶中,$CH_3OH$定容至刻度线,得到不同质量浓度的混合标准溶液2~5,其中,BaP质量浓度分别为20.00、10.00、5.00和2.00 μg/L,AT质量浓度分别为1 000.00、500.00、250.00和100.00 μg/L;移液器移取1 mL混合标准溶液3置于10 mL容量瓶中,$CH_3OH$稀释至刻度线,得到混合标准溶液6,其中,BaP和AT的质量浓度分别为1.00和50.00 μg/L。

### 1.5 样品检测

使用超声后的甲醇和超纯水作为流动相,其中$CH_3OH$与$H_2O$的体积比为9∶1,洗脱方式为等速洗脱,流速设置为0.8 mL/min;RF-20A检测器$\lambda_{ex}$为303 nm,$\lambda_{em}$为425 nm;SPD-20A检测器波长为225 nm;柱温设定为40 ℃;进样体积设为15 μL。依次检测空白实验、混合标准溶液1~6、实际样品。

### 1.6 不确定度

地表水中BaP和AT的质量浓度计算公式为

$$\rho_{样品}=\frac{\rho_{理论}\times V_1}{V}, \tag{1}$$

式中:$\rho_{样品}$为地表水中不同组分的质量浓度;$\rho_{理论}$为从标准曲线中查得组分的质量浓度;$V_1$为萃取浓缩后的体积;$V$为水样体积。

根据计算公式和检测过程,HPLC测定地表水中的BaP和AT质量浓度的不确定度主要来源于样品称量、标准溶液和前处理过程等。样品称量的不确定度包括量筒、移液器等量器的使用;标准溶液不确定度主要来自于自身纯度及配制、稀释过程中移液器、玻璃仪器的使用;前处理过程不确定度来源于全自动SPE仪上样、萃取、浓缩及定容等样品提取过程。本工作根据实际分析过程,从样品重复测定、标准溶液配制、标准曲线拟合和样品前处理过程4个方面分别进行BaP和AT不确定度的评定。注:2个组分的计算公式一致。

#### 1.6.1 样品重复测定

样品重复性测定引入的相对标准不确定度($u_{rel}(1)$)是指将地表水样品平行测定数次,用于评定样品处理过程的一致性。可体现随机因素,如样品不均匀、环境波动和人为操作等对测定的影响。计算公式为[17]:

$$u(x)=\frac{s(x)}{\sqrt{n}}, \tag{2}$$

$$u_{rel}(x)=\frac{u(x)}{\bar{\rho}}, \tag{3}$$

式中:$u(x)$为标准不确定度;$s(x)$为用统计分析方法获得的实验标准偏差;$n$为测量次数,$n$=10;$u_{rel}(x)$为相对标准不确定度;$x$为输入量的测得值;$\bar{\rho}$为算术平均质量浓度值。

#### 1.6.2 标准溶液配制

标准溶液配制的相对标准不确定度($u_{rel}(2)$)由标准溶液的纯度及配制过程中使用的移液器、容量瓶引入。计算公式为[27]:

$$u_{rel(纯)}=\frac{a}{\rho_{标}\times k}, \tag{4}$$

$$u_{rel(容)}、u_{rel(移)}=\sqrt{n\times\left(\frac{\Delta V}{k\times V}\right)^2}, \tag{5}$$

$$u_{rel(温)}=\sqrt{n\times\left(\frac{\Delta T\times\alpha}{k}\right)^2}, \tag{6}$$

$$u_{rel}(2)=\sqrt{u^2_{rel(纯)}+u^2_{rel(容)}+u^2_{rel(移)}+u^2_{rel(温)}}, \tag{7}$$

式中:$u_{rel(纯)}$、$u_{rel(容)}$、$u_{rel(移)}$和$u_{rel(温)}$分别为由标准品纯度、容量瓶、移液器和温度波动引入相对标准不确定度;$a$为被测量可能值之间的半宽度,若给出扩展不确定($U$),$a=U$;$\rho_{标}$为标准溶液质量浓度,单位为mg/L;$k$为置信因子,矩形(均匀)分布下$k=\sqrt{3}$,若假定为三角分布,则$k=\sqrt{6}$;$n$为使用次数;$\Delta V$为容量允差,单位为mL;$\Delta T$为温度允差,单位为℃;$\alpha$为甲醇的体积膨胀系数,20 ℃时,$\alpha=1.2\times10^{-3}$/℃[28]。

#### 1.6.3 样品前处理过程

样品前处理过程的相对标准不确定度($u_{rel}(3)$)主要由量筒量取、氮吹管定容及SPE仪的萃取过程引入,由萃取引入的不确定度可用加标回收率评定。计算公式如下:

$$u_{量}、u_{定}=\frac{a}{k}, \tag{8}$$

$$u_{rel(量)}=\frac{u_{量}}{V_{量}},\ u_{rel(定)}=\frac{u_{定}}{V_{定}}, \tag{9}$$

$$u_{rel}(3)=\sqrt{u^2_{rel(量)}+u^2_{rel(定)}+u^2_{rel(萃)}}, \tag{10}$$

式中:$u_{量}$、$u_{定}$分别为由量筒、定容引入的标准不确定度;$V_{定}$、$V_{量}$指量筒、容积体积;$u_{rel(萃)}$计算公式同式(2)和(3)。

#### 1.6.4 标准曲线拟合

标准曲线拟合的相对标准不确定度($u_{rel}(4)$)指由标准曲线计算质量浓度时,所得到的不确定度。在样品测试时被测物质信号强度与其质量浓度成正比,根据最小二乘法可将标准溶液的信号强度与

其对应质量浓度的关系拟合成一条直线。然而当线性相关系数$r\neq1$时,并非所有的曲线点都落在标准曲线上,因此,标准曲线本身具有不确定性。通常由曲线拟合引入的不确定度是整个实验的重要来源。分别测量BaP和AT的标准溶液,每个质量浓度重复测定3次,得到相应的色谱峰面积($A$),通过Origin软件拟合而成的线性回归方程为

$$A = b\rho + a, \tag{11}$$

式中:$A$为仪器所示被测组分的峰面积;$b$为斜率;$\rho$为组分的质量浓度;$a$为截距。$u_{rel}(4)$计算公式为:

$$S_A = \sqrt{\frac{1}{n-2}\sum_{i=1}^{n}\left[A-(b\rho+a)\right]^2}, \tag{12}$$

$$u_{rel}(4) = \frac{S_A}{b}\sqrt{\frac{1}{N}+\frac{1}{n}+\frac{\left(\rho_{样品}-\bar{\rho}_{标}\right)^2}{\sum_{i=1}^{n}\left(\rho-\bar{\rho}_{标}\right)^2}}, \tag{13}$$

式中:$S_A$代表标准溶液峰面积的标准偏差;$n$为标准曲线每个浓度点测定的总次数,本次实验中5个质量浓度重复测定3次,$n$=15,$i$=1,2,3,…,15;$N$为对样品中BaP或AT的$\rho_{样品}$的测定次数,$N$=10;$\bar{\rho}_{标}$为系列标准溶液的平均质量浓度。

**1.6.5** 总不确定度

4个方面引入的总相对标准不确定度($u_{rel}$)计算公式为

$$u_{rel} = \sqrt{u_{rel}^2(1)+u_{rel}^2(2)+u_{rel}^2(3)+u_{rel}^2(4)}。\tag{14}$$

**1.6.6** 扩展不确定度

扩展不确定度定义为确定测量结果区间的量,合理赋予被测量之值分布的大部分可望含于此区间[16]。计算公式为

$$U = k \times u_{rel} \times \bar{\rho}, \tag{15}$$

相对扩展不确定度($U_{rel}$)计算公式为

$$U_{rel} = k \times u_{rel}, \tag{16}$$

式中$k$=2。

### 1.7 统计学处理

总体均值与某一已知值相等的统计检验常用于比较测量值的总体均值与该已知值之间是否存在差异。检验方法以$t$检验法应用最为广泛。设测量值的总体遵从于正态分布,$x_1, x_2, \cdots, x_n$为来自总体的一组测量值,样本均值为$\bar{x}$,样本方差为$s^2$。当$\mu_0$为已知常数时,总体均值$\mu$与$\mu_0$相等的统计检验按以下公式进行[29]:

建立假设$H_0$,$H_0$:$\mu=\mu_0$,

$$t = \frac{\bar{x}-\mu_0}{s/\sqrt{n}}, \tag{17}$$

对于双侧检验,若$|t|>t_{\alpha(f)}$,则认为$\mu\neq\mu_0$,拒绝$H_0$;若$|t|\leqslant t_{\alpha(f)}$,则认为$\mu=\mu_0$,不拒绝$H_0$。其中,$\alpha$为显著性水平,$f$为自由度。

## 2 结　果

### 2.1 样品重复测定不确定度

平行检测10次,地表水样品中BaP和AT的质量浓度分别为2.01和50.09 ng/L,$u(1)$分别为0.049 5和1.386 4 ng/L,$u_{rel}(1)$分别为0.024 62和0.027 68。

### 2.2 标准溶液配制不确定度

**2.2.1** 标准品纯度不确定度

BaP标准溶液相对扩展不确定度为3.0%($k$=2),$u_{rel(纯)}=\frac{3.0\%}{2}=0.015\,00$;AT标准溶液相对扩展不确定度为4.0%($k$=2),$u_{rel(纯)}=\frac{4.0\%}{2}=0.020\,00$。

**2.2.2** 容量瓶不确定度

标准工作溶液配制过程中,容量瓶的使用情况、容量允差、使用次数及相对标准不确定度列于表1。容量瓶的容量允差参照《常用玻璃量器:JJG 196—2006》[30]。经检定,标准容量为10 mL的单标线容量瓶级别为A级,假定为三角分布[31],则BaP和AT的$u_{rel(容)}$分别为0.002 16和0.002 00。

**表1 容量瓶引入的相对标准不确定度**

| 组分 | 容量瓶体积/mL | 容量允差/mL | 使用次数 | 相对标准不确定度 |
|---|---|---|---|---|
| BaP | 10 | ±0.020 | 7 | 0.002 16 |
| AT | 10 | ±0.020 | 6 | 0.002 00 |

注:BaP为苯并[a]芘;AT为阿特拉津。

**2.2.3** 移液器不确定度

标准工作溶液配制过程中,移液器的量程、使用情况和容量允差等信息列于表2。移液器容量允许误差参照《移液器:JJG 646—2006》[32]。以矩形分布计算[33],在BaP和AT标准工作溶液配制过程中,不同量程不同使用次数时,移液器引入的$u_{rel(移)}$为0.005 77~0.020 41,由于配置溶液过程中,需要组合不同的量程和使用次数,经计算,移液器引入的合成$u_{rel(移)}$分别为0.020 41和0.018 48。

**2.2.4** 温度不确定度

实验室内温度在(20±2) ℃,温度波动引起溶剂体积的改变需考虑。由环境温度变化引入的容量

表2 移液器引入的相对标准不确定度

| 吸取体积/μL | 量程/μL | 容量允差/μL | 使用次数 | | 相对标准不确定度 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | BaP | AT | BaP | AT |
| 100 | 20~200 | ±2.00 | 1 | 1 | 0.011 55 | 0.011 55 |
| 200 | 20~200 | ±3.00 | 1 | 0 | 0.008 66 | — |
| 250 | 25~250 | ±3.75 | 1 | 1 | 0.008 66 | 0.008 66 |
| 500 | 100~1 000 | ±5.00 | 1 | 1 | 0.005 77 | 0.005 77 |
| 1 000 | 100~1 000 | ±10.00 | 3 | 3 | 0.010 00 | 0.010 00 |

注:—指未使用量程为20~200 μL的移液器吸取液体。

瓶和移液器的$u_{rel}$结果列于表3。BaP和AT标准工作溶液配制过程中,20 ℃时,累积使用数次容量瓶和移液器后,当$\alpha$=1.2×10$^{-3}$/℃,$u_{rel(温)}$分别为0.005 19和0.004 79。

表3 20 ℃时容量瓶和移液器使用次数引入的相对标准不确定度

| 组分 | 使用次数 | | 相对标准不确定度 | | 合成相对标准不确定度 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 容量瓶 | 移液器 | BaP | AT | |
| BaP | 7 | 7 | 0.003 67 | 0.003 67 | 0.005 19 |
| AT | 6 | 6 | 0.003 39 | 0.003 39 | 0.004 79 |

经计算,由标准品纯度、容量瓶、移液器和温度波动引入的BaP和AT的$u_{rel}$(2)分别为0.025 95和0.027 72。

### 2.3 样品前处理过程不确定度

#### 2.3.1 量筒不确定度

样品量取使用1 000 mL的量筒,分度值为10 mL。已知1 000 mL量出式容量瓶容量允差为±10 mL[30]。假定为矩形分布,则$u_{rel(量)}$=0.005 77。

#### 2.3.2 定容不确定度

定容使用10 mL氮吹管,底部为带刻度细管,分度值为0.1 mL。检定点选择0.5 mL,使用恒量法检定氮吹管的实际容量。温度为20 ℃时,氮吹管检定刻度在0.5 mL时的实际体积($V_{0.5}$)容量实测值为(0.50±0.01)mL。假定为矩形分布,经计算得,$u_{rel(定)}$=0.011 55。

#### 2.3.3 萃取不确定度

用高格河地表水样品进行6次加标实验,BaP和AT的加标量分别为1和50 μg/L,BaP的平行加标回收率分别为86.3%、75.9%、89.0%、79.3%、86.7%和82.1%,AT的平行加标回收率分别为88.5%、78.6%、81.6%、76.9%、85.3%和86.4%。采用$t$检验法验证BaP和AT的平均加标回收率与1有无显著性差异($t$=8.215、9.125)。给定α=0.05,由$t$表查得$t_{0.05(5)}$=2.571,$t>t_{0.05(5)}$,因此,平均加标回收率与给定回收率有显著性差异,加标回收的影响必须考虑在内,即不能忽略由萃取引入的不确定度。计算得出,BaP和AT的$u_{(萃)}$分别为0.020 4和0.018 8,$u_{rel(萃)}$分别为0.024 55和0.022 63。

由样品量取、定容和萃取等前处理过程引入的BaP和AT的$u_{rel}$(3)分别为0.027 74和0.026 05。

### 2.4 标准曲线拟合不确定度

不同质量浓度标准溶液的峰面积结果见表4。BaP和AT标准溶液的平均质量浓度分别为7.60 μg/L和0.38 mg/L。由平均峰面积拟合线性回归方程。BaP的回归方程为$A$=93 849.8$\rho$−379.2,$r$=0.999 9;AT回归方程为$A$=188 238.4$\rho$−293.6,$r$=0.999 9。对于BaP,$S_A$=5 485.1,$u_{rel}$(4)=0.037 24;对于AT,$S_A$=520.8,$u_{rel}$(4)=0.001 63。

### 2.5 总不确定度

由以上数据可计算,BaP和AT的$u_{rel}$分别为0.058 62和0.047 07。

### 2.6 扩展不确定度

依据国家计量检定规程规定[16-17],对大多数测量不确定度评估,取置信水平95%,$k$=2,则本实验地表水中,BaP的$U$=0.24 ng/L,由此得到,HPLC法测定地表水中BaP质量浓度为(2.01±0.24)ng/L,$k$=2;AT的$U$=4.72 ng/L,AT质量浓度为(50.09±4.72)ng/L,$k$=2。BaP和AT的$U_{rel}$分别为11.8%和9.4%。

## 3 讨 论

本工作运用全自动SPE-HPLC双检测器法同时检测BaP和AT含量。使用C18柱为SPE柱,$CH_2Cl_2$为洗脱剂进行前处理,测得BaP与AT平均加标回收率分别为83.2%和82.9%,均能达到生态环境质量控制一般要求(60.0%~120.0%)[23],将BaP与AT合并检测方法可行。与单独检测BaP或AT的类似论文相比,胡鸿雁等[34]使用HPLC检测自来水中的AT,加标量为1.00 mg/L时,平均加标回收率为94.0%,

**表4　不同质量浓度的标准溶液的峰面积**

| 试剂 | 标准溶液质量浓度/(μg·L$^{-1}$) | 峰面积1/μV | 峰面积2/μV | 峰面积3/μV | 平均峰面积/μV |
|---|---|---|---|---|---|
| BaP | 1.00 | 95 203 | 97 946 | 94 512 | 95 887 |
| | 2.00 | 191 441 | 190 459 | 189 729 | 190 543 |
| | 5.00 | 472 519 | 473 600 | 474 510 | 473 543 |
| | 10.00 | 922 995 | 921 423 | 917 736 | 920 718 |
| | 20.00 | 1 864 140 | 1 885 726 | 1 901 255 | 1 883 707 |
| AT | 50.00 | 9 432 | 9 646 | 9 503 | 9 527 |
| | 100.00 | 18 045 | 17 993 | 18 448 | 18 162 |
| | 250.00 | 44 876 | 46 211 | 46 157 | 45 748 |
| | 500.00 | 95 183 | 95 099 | 95 435 | 95 239 |
| | 1 000.00 | 188 213 | 187 784 | 186 530 | 187 509 |

本文的加标量为50.00 μg/L,平均加标回收率为82.9%,回收率低与本文的加标量少有一定关系,因为低质量浓度样品经萃取、净化和浓缩,损失往往比高质量浓度样品大。另外,本文是对地表水进行加标,地表水基质比自来水复杂,造成加标回收率与文献不同。陈东洋等[35]以SPE为前处理,使用LC荧光检测器进行了饮用水中BaP的测试,其3个加标质量浓度(0.05、0.10、0.20 μg/L)的平均加标回收率为86.1%~97.2%,整体高于本文的83.2%,推测原因可能与样品前处理方法有关,文献使用ENVI-18的SPE柱,水样中$CH_3OH$加入体积分数为10.0%,而本工作使用C18的SPE柱,水样中甲醇含量为1.0%,SPE条件不同,导致最终回收率的差别。因此,为了提高萃取效果,本文的SPE条件仍需进一步优化。

同时,本工作进行了不确定度分析,得出不确定度主要由有证标准物质纯度、容量瓶计量性能、移液器计量性能、环境温度、固相萃取过程和标准曲线拟合等方式引入。评定兼顾影响检测的各个环节和步骤,与文献相比更为完善。如:冯静等[21]对HPLC测定地下水中的BaP进行了不确定度评定,认为不确度来源于样品取样量、定容体积和样品重复性测定等方面,但未对前处理过程进行评定,与之相比,本工作将SPE过程引入的不确定度用加标回收率评定,在不确定度分量的确定上更为合理;Chen等[20]在对食品中诱惑红检测进行不确定度评定时,忽略了标准曲线拟合的不确定度分析,与之相比,本工作进行了标准曲线拟合,并证实了对于低质量浓度BaP样品,标准曲线拟合是影响检测的最大不确定度分量;Evangelia等[5]进行了标准溶液制备(称量、容量瓶、标准物质和溶剂的化学纯度),移液管和校准曲线的构建可能存在的不确定评定,得到的BaP和AT的$U_{rel}$分别为8.0%和24.2%,与其相比,本方法测量的BaP的相对扩展不确定度略高,$U_{rel}$=11.8%,原因可能是本方法与之相比增加了样品重复测定、温度和样品前处理等的不确定度评定,而AT的相对扩展不确定度更低,$U_{rel}$=9.4%,表明更适合AT的检测。

从不确定度评定过程可知:按照$u_{rel}$的高低,影响BaP检测结果的不确定度分量主要是标准曲线拟合和样品前处理过程,次要为标准溶液配制过程;影响AT最终检测结果的不确定度分量主要由样品重复测定和标准溶液配制过程引入,次要为样品前处理过程。因此,实际操作中可采取增加样品的平行测定次数,选择高纯度标准溶液、高精度量器,优化前处理方法,提高检测人员技术水平等方法,减小不确定度的引入,提高分析结果的准确性。

## 4　结束语

本实验使用全自动SPE仪进行预处理,同时提取地表水中的BaP和AT,利用HPLC紫外检测器测定AT含量,荧光检测器测定BaP含量,并合理评定了检测结果的不确定度,分析了测定过程中的不确定度来源及其对测定结果的影响,为HPLC法测定地表水中BaP和AT含量的评定方法提供了参考。但本前处理方法同时提取BaP和AT回收率不够理想,下一步将继续优化SPE条件,提高总体回收率。

### 参 考 文 献

[1] 孔蒙蒙,黄忠民,潘志利,等.食品中致癌物质苯并芘检测方法研究进展[J].食品与营养科学,2018,7(4):251-256.

[2] 余刚,牛军峰,黄俊,等.持久性有机污染物:新的全球性环境问题[M].北京:科学出版社,2005:91-92.

[3] NRIAGU J O, PACYNA J M. Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils by

trace metals[J]. Nature,1988,333(6169):134-139.
[4] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for atrazine [M]. US: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2003:1-222.
[5] EVANGELIA T, DIMITRA V, GEORGE K. A multi-residue method for determination of 70 organic micropollutants in surface waters by solid-phase extraction followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Environmental Science and Pollution Research,2015,22:1095-1112.
[6] CHRISTINE E, PETER B, FRIEDRICH W, et al. Multi-component trace analysis of organic xenobiotics in surface water containing suspended particular matter by solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2012(1249):181-189.
[7] CORMAN M E, ARMUTCU C, UZUN L, et al. Rapid, efficient and selective preconcentration of benzo[a]pyrene (BaP) by molecularly imprinted composite cartridge and HPLC[J]. Materials Science & Engineering C, 2017, 70(1):41-53.
[8] 韩毅.全自动固相萃取-高效液相色谱法测定水中苯并[a]芘的含量[J].理化检验(化学分册),2022,58(1):116-117.
[9] 孙静.气相色谱-质谱联用技术研究进展及前处理方法综述[J].当代化工研究,2017(9):4-5.
[10] BIRD I M. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications[J]. British Medical Journal,1989,299(6702):783-787.
[11] 柳仁民.仪器分析实验[M].青岛:中国海洋大学出版社,2009.
[12] 李吉海,刘金庭.基础化学实验(Ⅱ):有机化学实验[M].北京:化学工业出版社,2007.
[13] 刘宇,李国文,王蓉,等.液液萃取-GC/MS检测饮用水中33种半挥发性有机物[J].食品工业,2019,40(12):271-274.
[14] 李文文,唐道军,张蓉蓉,等.固相萃取GC-MS/MS法测定海水中多环芳烃研究[J].宁波大学学报(理工版),2021,34(4):15-20.
[15] International Organization for Standardization. Guide to the expression of uncertainty in measurement [S]. Geneva: ISO, 1993.
[16] 国家市场监督管理总局.化学分析测量不确定度评定:JJF 1135—2005[S].北京:中国计量出版社,2005.
[17] 国家市场监督管理总局.测量不确定度评定与表示:JJF 1059.1—2012[S].北京:中国质检出版社,2013.
[18] 魏昊,乔东.化学分析中不确定度的评估指南[M].北京:中国计量出版社,2002.
[19] TATJANA T, NADA U N, SANDRA B, et al. Estimating measurement uncertainty in high-performance liquid chromatography methods[J]. Accreditation and Quality Assurance,2012,17(3):291-300.
[20] CHEN Y, ZHAO Y, WANG H M, et al. Measurement uncertainty assessment for determination of Allura Red in puffed food by HPLC[J]. Current Medical Science, 2018,38(2):324-328.
[21] 冯静,王海娇,何超君,等.高效液相色谱法测定地下水中苯并[a]芘的不确定度评定[J].岩矿测试,2011,30(5):617-622.
[22] 生态环境部.水质阿特拉津的测定高效液相色谱法:HJ 587—2010[S].北京:中国环境科学出版社,2010.
[23] 生态环境部.水质多环芳烃的测定液液萃取和固相萃取高效液相色谱法:HJ 478—2009[S].北京:中国环境科学出版社,2010.
[24] 国家卫生健康委,中国国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法农药指标:GB/T 5750.9—2006[S].北京:中国标准出版社,2006.
[25] 水利部.水质阿特拉津的测定固相萃取-高效液相色谱法:SL 761—2018[S].北京:中国水利水电出版社,2018.
[26] 生态环境部,国家市场监督管理总局.地表水环境质量标准:GB 3838—2002[S].北京:中国环境科学出版社,2002.
[27] 王邱,刘德群,周铭林,等.高效液相色谱法对食品中苯并芘含量测定的不确定度评定[J].粮油食品科技,2021,29(1):173-179.
[28] 祝海珍.HPLC法测定动物肝脏中维生素A含量的不确定度评定[J].食品研究与开发,2018,39(7):160-165.
[29] 中国环境监测总站.环境水质监测质量保证手册[M].2版.北京:化学工业出版社,2019.
[30] 国家市场监督管理总局.常用玻璃量器:JJG 196—2006[S].北京:中国计量出版社,2007.
[31] 程瑞明.化学分析测量不确定度分量分布类型的研究[J].中国卫生产业,2012(7):117-118.
[32] 国家市场监督管理总局.移液器:JJG 646—2006[S].北京:中国计量出版社,2007.
[33] 赵海峰,张辉珍,谢寒冰,等.移液枪和移液管对测量结果不确定度的影响[J].中国卫生检验杂志,2015,25(21):3775-3778.
[34] 胡鸿雁,张红雨,张杰.固相萃取-高效液相色谱法测定水中阿特拉津[J].环境科学与技术,2006,29(12):31-32+117.
[35] 陈东洋,冯家力,张昊,等.固相萃取/高效液相色谱法测定饮用水中苯并[a]芘及双酚A[J].分析测试学报,2015,34(7):848-851.

(责任编辑:王 媛)