



# 水中新污染物分析创新实验的设计与实践

方淑红, 林 瑜, 刘 伟, 孙 静, 杨迎春

(成都信息工程大学 资源环境学院, 成都 610225)

**摘要:** 以最新的环境问题为导向设计了采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定自来水中全氟辛酸(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)的综合创新教学实验。学生通过固相萃取(SPE)法将水中的PFOA和PFOS富集,洗脱后浓缩定容转移至样品瓶,而后用UPLC-MS/MS测定PFOA和PFOS的浓度。通过将新污染物分析技术的科研成果融入实验教学环节中,综合考查学生的实验技能及科学素养,系统全面地培养了学生利用专业知识认识环境问题的能力,提升了学生的综合素养。

**关键词:** 综合创新实验;超高效液相色谱-串联质谱;固相萃取;全氟辛酸;全氟辛烷磺酸

中图分类号: G642.0

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20220476

## Design and Practice of Innovative Experiment on Analysis of Emerging Contaminants in Water

FANG Shuhong, LIN Yu, LIU Wei, SUN Jing, YANG Yingchun

(College of Resources and Environment, Chengdu University of Information Technology, Chengdu 610225, China)

**Abstract:** Comprehensive innovative teaching experiment on analysis of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in water by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was designed according to the latest research results. Solid-phase extraction (SPE) was used to enrich PFOA and PFOS in water, and then PFOA and PFOS were eluted, concentrated and transferred to sample vials for analysis by UPLC-MS/MS. This experiment could not only comprehensively examine students' experimental skills and scientific literacy, but also systematically train students' professional knowledge to understand environmental problems by combining with new research on analysis technology of emerging pollutants. Finally, the comprehensive quality of students would be enhanced.

**Key words:** comprehensive innovative experiment; UPLC-MS/MS; solid-phase extraction; PFOA; PFOS

根据《普通高等学校本科专业类教学质量国家标准》中对环境科学与工程类人才培养的基本要求,需要培养学生认识环境问题、分析环境问题的能力,要求学生具备一定的创新能力、实践能力和专业素养,同时具有较强的自主学习、书面表达、交流沟通能力及团队合作精神。这些能力在实践类教学环节(如实验课程)中可以得到较好的培养和锻炼<sup>[1-2]</sup>。目前环境类的实验项目多以

专业课为基础进行开设,内容独立、课时紧密,在一定程度上导致学生的参与度及综合运用专业知识的能力有所欠缺。而开放性综合实验可以充分调动学生利用所学的专业知识认识环境问题、分析环境问题的积极性,激发学生的求知欲,系统全面地培养学生的创新意识和科学素养<sup>[3-5]</sup>。

国内外广泛关注的新型污染物主要包括国际公约管控的持久性有机污染物(多溴联苯醚、全氟化

收稿日期: 2022-08-01; 修回日期: 2023-04-24

基金项目: 国家自然科学基金(21607018); 成都信息工程大学“环境科学”国家级一流专业建设项目(高教厅函[2022]14号); 四川省第二批地方普通本科高校应用型示范课程(2020-2024); 成都信息工程大学本科教学工程项目(JYJG2021131)。

作者简介: 方淑红(1986-), 女, 博士, 副教授, 主要从事新污染物在环境中的迁移及风险评估方面的研究。E-mail: fsh@cuit.edu.cn

合物等)、内分泌干扰物、抗生素、微塑料等。全氟化合物(perfluoroalkylated substances, PFASs)这类新型持久性有机污染物已经在环境中普遍检出<sup>[6-7]</sup>,甚至在青藏高原也检测到了一定浓度的PFASs<sup>[8-9]</sup>。其高富集特性和“三致”毒性引起国际国内社会的高度重视。现有研究表明PFASs的高暴露量与膀胱癌、肾癌、睾丸癌、溃疡性结肠炎、高胆固醇和高尿酸血症、甲状腺疾病等存在相关性<sup>[10-13]</sup>,威胁环境安全及人体健康。《中共中央关于制定国民经济和社会发展第十四个五年规划和二〇三五年远景目标的建议》也提出要重视新污染物治理。饮用水是PFASs进入人体的重要途径,加拿大、美国、欧洲国家等已经出台自来水中PFASs控制标准<sup>[14]</sup>,我国正在实施的《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)也将PFOA和PFOS纳入管控指标,分别为80 ng/L和40 ng/L。而准确地检测自来水中PFASs的浓度水平是评估其健康风险的基础,为环境类本科生开设饮用水中PFASs测定的开放性综合实验,不仅符合国家发展战略,也符合国家的人才培养需求。该实验的开设,可以培养学生查阅文献、总结文献的能力,可以让学生接触和掌握更前沿的实验技术及手段,可以激发学生自主学习的能力和团队合作能力,为学生认识、分析并解决新兴的环境污染问题打下坚实的基础。

## 1 实验思路设计

本实验面向环境科学、环境工程专业高年级学生开放,学生已经先修分析化学、有机化学、环境监测等课程,要求学生熟练掌握环境样品的布点采样要求,有机化学纯化、浓缩技术,色谱、质谱的基本原理。实验的主要教学目标是训练和考查学生综合运用所学环境、化学相关知识及实验技能的能力,提高学生利用现代仪器分析方法解决实际环境问题的能力。基于以上考量,本实验的教学目标如下。

- 1) 查阅文献,了解PFASs的理化性质、前处理方法及分析技术;
- 2) 掌握自来水样的采集及保存;
- 3) 掌握SPE富集净化自来水中PFASs的原理及操作;
- 4) 掌握UPLC-MS/MS的原理、基本操作及日常维护。

## 2 实验课程设计

本实验共16个学时,面向环境类大三的学生开放。指导教师于开课一周向学生布置实验课程要求,要求学生查阅PFASs的相关文献,了解PFASs的理化性质,总结PFASs的分析检测方法。设置2个学时的实验方案讨论环节,让学生根据查阅的文献设计PFASs的前处理及仪器检测方法,并阐明依据。然后教师指导学生优化和完善实验方案。由于实验步骤较为复杂,指导教师需要对关键步骤进行演示操作,并进行原理讲解。邀请仪器厂家工程师前来为学生讲解仪器原理、构造及操作,并录制视频供学生反复学习,增加学生对仪器理解的深度和操作的熟练程度。实验内容为14个学时,在实验过程中,2~3个学生一组,以团队的方式完成实验并撰写实验报告。由于大型仪器设备费用较高,实验室配备数量有限,在分析测定的过程中需要排队等候,利用传统的上课学时很难完成教学工作。因此,本实验项目设置为开放性实验,开放时间为30天,学生自主选择连续的时间预约进实验室操作。教师扮演指导者的角色,学生遇到问题可以随时和老师沟通交流,教师引导学生剖析问题并解决问题,既解决了仪器紧张的问题,也提高了学生的参与度。学生不仅掌握了大型先进仪器的使用,还培养了独立开展科研的能力,为今后从事环保工作打下坚实的基础。

本实验为综合性实验,涉及分析化学、有机化学、环境监测等课程的知识点。为了加深学生对本实验项目的理解,采用制作多媒体课件、录制视频等方式对实验原理、实验操作、仪器操作、注意事项等问题进行充分的讲解,并上传到教学平台,供学生下载学习,有助于学生对原理、操作步骤及仪器使用的掌握。

## 3 学生实验的完整示例

### 3.1 实验原理

本实验的实验原理包括SPE技术原理、超高效液相色谱及质谱的构造及原理。

#### 3.1.1 SPE技术

SPE是利用固体吸附剂将液体样品中的目标化合物与干扰化合物分离,达到分离和富集目标化合物的目的。在水样分析过程中,常常使用固

相萃取法将目标分析物从水样中提取出来并加以浓缩。此方法有利于低浓度水样的富集检测, 提高了方法检出限。水样 PFASs 的前处理固相萃取柱常用的填料有水可浸润性反相吸附剂、混合型弱阴离子反相吸附剂。

### 3.1.2 超高效液相色谱

常规液质联用仪的液相包含泵、进样器、柱温箱, 根据目标物选择合适的填料及规格的色谱柱。

泵的基本原理如图 1 所示(以本研究使用的安捷伦 G7120A 二元泵为例), 二元泵主要由 2 个泵头组成, 用 2 个泵头分别控制泵出的液体, 因此

一次只能使用 2 个流动相。溶剂选择阀将流动相 A 分成 A<sub>1</sub> 和 A<sub>2</sub>, 流动相 B 分成 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub>, 方便切换流动相。流动相经过脱气机过滤掉细微的气泡, 流过泵头后, 在排气阀处进行初步混合, 再流经混合器混合均匀, 同时压力传感器记录系统的压力。混合后的流动相再进入下一个模块自动进样器。

进样器的进样程序如图 1 所示, 首先, 六通阀切到旁路(1 连到 6); 然后, 计量泵进入初始位置, 机械臂将进样瓶移动到进样位置, 进样针下降到进样瓶中, 计量泵抽设定的进样量, 插入针座, 六通阀切到主路(1 连到 2)。

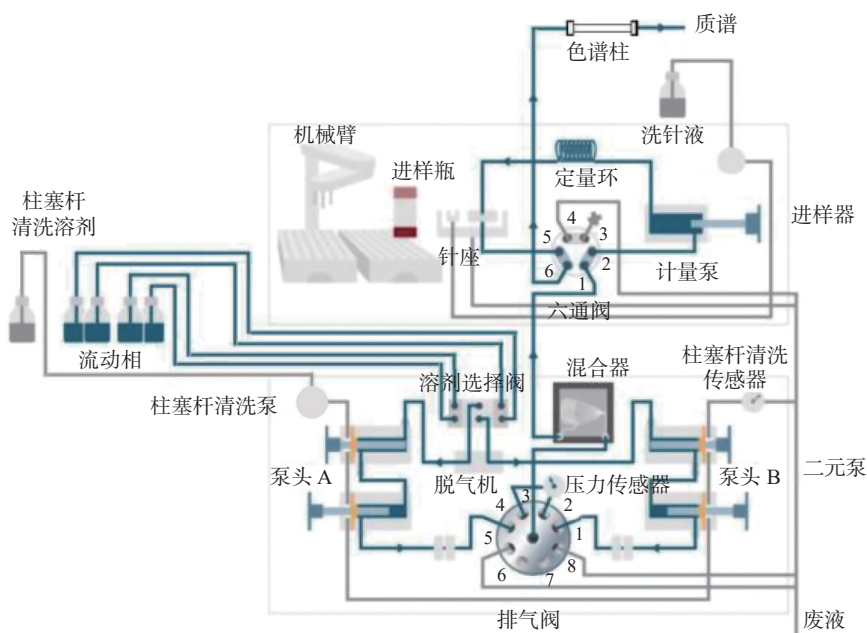


图 1 超高效液相色谱结构示意图

色谱柱起到分离作用, 流动相将进样器中的目标物带至色谱柱, 并在色谱柱上实现分离, 先后进入质谱, 实现质谱定性分析。

### 3.1.3 质谱

本研究中质谱为三重串联四级杆质谱, 组件构造如图 2 所示。重要组件有电喷雾离子源 (ESI)、四级杆质量分析器、碰撞池、检测器等。

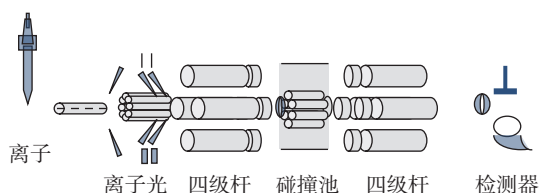


图 2 三重四级杆质谱构造示意图

ESI 是目前应用最多的电离方式, 具有极为广泛的应用领域。ESI 属于浓度敏感型离子化技术, 样品浓度越高, 灵敏度越高, 适合分析中等极性到极性的小分子。另外, 由于其可以产生多电荷离子的特性和相对较低的离子化温度, 因而也适合分析大分子有机化合物, 如全氟化合物、抗生素等。ESI 的工作原理如图 3 所示, 雾化器的喷雾针被带了高电压的半圆柱体形电极环绕, 带有被测物质离子的流动相, 在雾化针尖端发生雾化。在半圆形电极和毛细管间的电压不同, 产生一个电场, 使液滴表面富集带同种电荷的离子, 而内部带相反电荷聚集, 形成带电液滴细的喷雾, 液滴在电场的作用下, 飞向毛细管。加热的氮气干

干燥气体的反向流动, 带走液滴中的中性的溶剂分子, 从而收缩液滴, 直到排斥的静电力超过液滴表面张力, 引起库仑爆炸。这个过程不断重复, 直到待分析物离子最终变成气态进入毛细管。

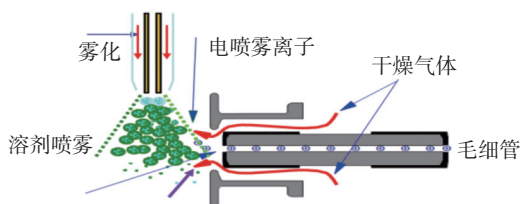


图 3 电喷雾离子源工作原理示意图

### 3.1.4 四极杆质量分析器的基本原理

四极杆分析器如图 4 所示, 由 4 根棒状电极组成, 它们距离相等并且互相平行, 这 4 个棒状电极形成一个四极电场。四极杆处于对角位置的两根杆被连接在一起, 其中一对杆之间施加电压 ( $V_{DC} + V_{RF}$ ),  $V_{DC}$  为直流电压,  $V_{RF}$  为射频电压。同时在另外一对杆上施加大小相同、极性相反的直流电压和相位相反、振幅/频率相同的射频电压 ( $-(V_{DC} + V_{RF})$ )。直流电压与射频电压叠加在一起, 且两对电极的极性不停进行快速切换, 使得带电离子振荡通过四极杆。

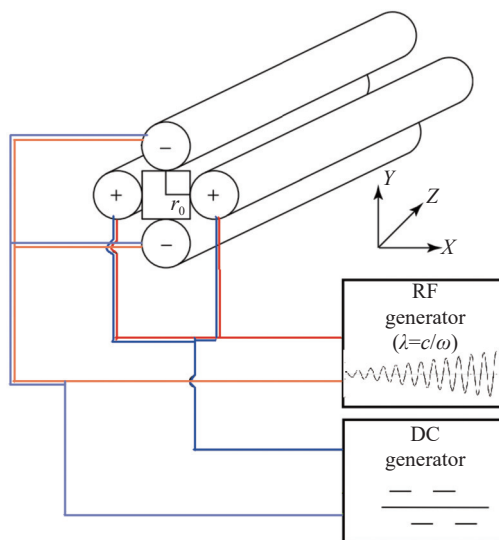


图 4 四极杆分析器原理及构造示意图

## 3.2 实验设备与实验材料

超高效液相色谱——串联质谱仪 (1290—6470, 安捷伦), C18 色谱柱 (Zorbax Eclipse Plus C18, 2.1×50 mm, 1.8 μm), SPE 装置 (12 位, 美国 Supelco 公司), 真空泵 (GM-0.33A, 天津市津腾实验设备有限公司), pH 计 (PHS-3C, 上海仪电科学

仪器股份有限公司), 氮吹仪, 高纯氮气。

实验标准品为高纯度混合标准, 标准品含有 PFOA 和 PFOS。对应的碳同位素标记品分别为  $^{13}\text{C}_4$ -PFOA 和  $^{13}\text{C}_4$ -PFOS。富集水样用 SPE 小柱。实验试剂包括甲醇 (色谱纯)、氨水 (28%)、磷酸缓冲液、冰乙酸、乙酸铵 (99%), Milli-Q 超纯水。

## 3.3 实验步骤

### 3.3.1 样品采集

样品可为居民楼自来水、饮用水源地水样、自来水厂不同工艺段水样等样品。使用聚丙烯塑料瓶作为样品储存容器, 避免使用聚四氟乙烯容器。采集前应将瓶子先后用甲醇、超纯水清洗, 采集时应润洗三次, 采集样品 500 mL。采样时应记录样品的名称、采样点位、采样日期、采样人员等信息。采样人员应及时填写采样记录或采样报告。样品应尽快运回实验室 4 °C 保存, 30 天内完成前处理。

### 3.3.2 自来水前处理

取 250 mL 水样, 调节 pH<3, 加入 2 ng 内标, 放置 2 h 后用 SPE 小柱富集并纯化, 具体操作如下: 先加入 4 mL 0.5% 氨水/甲醇, 然后依次加入 4 mL 甲醇及 4 mL 水活化; 活化完成后, 加入内标的水样以 1 滴/s 的速度过萃取柱; 萃取完成平衡 1 h 后用 4 mL 25 mmol/L 的乙酸缓冲液淋洗, 高真空抽干小柱约 5 min; 然后用 4 mL 甲醇及 8 mL 0.5% 氨水/甲醇洗脱目标物, 收集液氮吹至 0.5 mL, 0.22 μm 尼龙滤膜过滤, 待上机测定。空白实验样品处理步骤同样品一致。

### 3.3.3 仪器分析方法

采用 UPLC-MS/MS 及 C18 色谱柱对样品进行定性定量分析。样品进样量为 5.00 μL, 柱温设为 35 °C, 流速为 0.30 mL/min。流动相比例设置如下: 0~0.10 min, A 相 (5 mmol/L 乙酸铵溶液) 为 90.0%, B 相 (甲醇) 为 10.0%; 0.10~6.00 min, A 相由 90.0% 降为 5.0%; 6.00~8.00 min, A 相保持在 5.0%, 后运行 3.00 min。采用 ESI 源负离子模式和多反应检测模式 (MRM), 毛细管电压 3 000 V, 喷雾气压为 35 psi, 干燥气温度 250 °C, 目标化合物及内标检测离子和质谱条件如表 1 所示。

该仪器方法对 PFOA 和 PFOS 有较好的分离效果, 在同一浓度下, PFOA 的响应优于 PFOS, 分离及响应效果如图 5 所示。

表1 目标化合物仪器分析条件

| 目标物  | 定量离子    | 毛细管出口电压/V | 碰撞能/eV | 保留时间/min | 对应内标                               |
|------|---------|-----------|--------|----------|------------------------------------|
| PFOA | 413→369 | 70        | 10     | 5.34     | <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOA |
|      | 169     |           | 20     |          |                                    |
| PFOS | 499→99  | 190       | 50     | 5.62     | <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -PFOS |
|      | 80      |           | 60     |          |                                    |

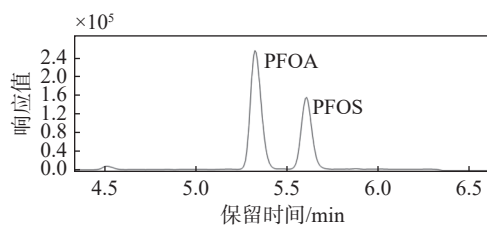


图5 PFOA和PFOS色谱图

## 4 教学实施及实验结果

### 4.1 质量控制及质量保证

学生通过查阅文献了解到, 聚四氟乙烯的容器会释放 PFASs, 为了避免样品在采集和前处理过程中受到污染, 整个实验过程避免使用聚四氟乙烯, 均采用聚丙烯材质的实验器材。为了监控整个实验过程是否有背景污染, 在采样过程中设置了过程空白, 即在采样时打开装有 Milli-Q 超纯水的聚丙烯瓶子 3.00 min, 随后按照和样品同样的方法进行分析。设定 5 ng/L 的回收率实验, 每个浓度水平做 3 个平行实验。两种 PFASs 加标回收率为 80.0%~81.7%, 如表 2 所示, 满足实验要求。实验的相对标准偏差为 5.4%~6.9%, 说明学生操作的重现性较好。本实验采用内标标准曲线法进行定量分析, 标准曲线范围为 0、0.5、1.0、2.0、5.0、20.0、50.0 ng/mL, 线性范围良好( $R^2 > 0.9999$ )。

表2 自来水中 PFOA 和 PFOS 的回收率、检出限及定量限

| PFASs | 回收率/% | RSD/% | LOD/(ng·L <sup>-1</sup> ) | LOQ/(ng·L <sup>-1</sup> ) |
|-------|-------|-------|---------------------------|---------------------------|
| PFOA  | 81.7  | 5.4   | 0.03                      | 0.10                      |
| PFOS  | 80.0  | 6.9   | 0.05                      | 0.20                      |

仪器检出限(LOD)为  $S/N$ (信噪比)为 3 时的浓度, 定量限(LOQ)为  $S/N$ (信噪比)为 10 时的浓度。PFOA 的 LOD 为 0.03 ng/L, LOQ 为 0.10 ng/L; PFOS 的 LOD 为 0.05 ng/L, LOQ 为 0.20 ng/L, 如表 2 所示。

通过学生实验的质量控制及质量保证数据可以看出, 大部分学生能够完成该实验并得到有效

数据。由于实验对操作技能要求较高, 仍有少数同学需要反复练习才能达到实验要求。学生普遍反映该实验能综合锻炼学生的实验技能, 收获较大。

### 4.2 样品数据结果

学生根据制定的采样方案, 从成都市武侯区、青羊区、成华区、锦江区及金牛区各采集 3 份自来水并进行 PFASs 的分析, 结果如表 3 所示, 成都市自来水中 PFOA 浓度为 1.25~3.89 ng/L, PFOS 浓度为 0.33~0.55 ng/L, 远低于《生活饮用水卫生标准》(GB 5749—2022)中规定的限值 80 ng/L (PFOA)和 40 ng/L (PFOS), 说明成都市自来水中 PFOA 和 PFOS 对人体无健康风险。

表3 成都市不同区域自来水中 PFOA 和 PFOS 的浓度

单位: ng·L<sup>-1</sup>

| PFASs | 采样点       |           |           |           |           |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|       | 青羊区       | 武侯区       | 成华区       | 锦江区       | 金牛区       |
| PFOA  | 3.41±1.60 | 3.64±2.29 | 1.25±0.10 | 3.89±2.63 | 1.86±0.18 |
| PFOS  | 0.42±0.02 | 0.37±0.01 | 0.55±0.07 | 0.35±0.01 | 0.33±0.11 |

### 4.3 撰写报告

传统的实验报告多数以实验目的、实验原理、实验步骤、数据分析等为主, 由于本实验为综合性实验, 综合考查学生利用已学的知识认识环境问题、分析环境问题的能力, 因此, 要求从研究背景、研究意义、技术路线、结果讨论等方面撰写报告。学生在撰写报告的过程中, 不仅系统地梳理了实验的目的和意义, 还可以更深刻地了解 PFASs 的污染来源、健康风险、控制技术和环境行为, 最后将创新实验总结成科学的学术报告, 提升了学生的学术思维能力, 提高了学生用科学语言阐述环境问题的能力。

## 5 结束语

通过设计 UPLC-MS/MS 法测定自来水中 PFASs 的开放性实验, 锻炼了学生查阅文献的能力, 强化了学生对 SPE 技术富集纯化有机污染物的原理和操作的掌握, 深化了学生对 UPLC-MS/MS 的原

理、操作及日常维护的理解。从学生的实验数据可以看出,学生能够按照实验方案顺利完成整个流程,并获得可靠结果,说明该实验可以培养学生的综合实验素养,不仅为学生掌握前沿的先进的实验分析技术提供基础平台,更是提升了学生的科研素养,为学生今后从事环境相关工作打下坚实的基础,满足新时期创新教育的需求。

### 参考文献

- [1] 朱玉平,张学军,高翔,等. 工程实践创新能力融合培养研究[J]. 实验科学与技术, 2022, 20(3): 45-48.
- [2] 宿艳,杨成,张洪一,等. FRAP 分光光度法测定饮品中还原性物质的实验教学设计[J]. 实验科学与技术, 2021, 19(2): 497-100.
- [3] 刘贵芹. 深化高校创新创业教育改革 进一步提高人才培养质量[J]. 中国高等教育, 2016(21): 5-7.
- [4] 余海昌. 深化高校创新创业教育改革须正确处理好四对关系[J]. 教育理论与实践, 2020, 40(24): 16-18.
- [5] 梁楠,张晓. 基于STEP 理念的大学生创新教育与实践[J]. 实验室研究与探索, 2022, 41(3): 161-164.
- [6] WANG Q, ZHAO Z, RUAN Y F, et al. Occurrence and distribution of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in natural forest soils: A nationwide study in China[J]. *Science of The Total Environment*, 2018, 645: 596-602.
- [7] FANG S H, SHA B, YIN H L, et al. Environment occurrence of perfluoroalkyl acids and associated human health risks near a major fluorochemical manufacturing park in southwest of China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 396: 122617.
- [8] AAS C B, FUGLEI E, HERZKE D, et al. Effect of body condition on tissue distribution of perfluoroalkyl substances (PFASs) in Arctic Fox (*Vulpes lagopus*)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(19): 11654-11661.
- [9] WANG X P, CHEN M K, GONG P, et al. Perfluorinated alkyl substances in snow as an atmospheric tracer for tracking the interactions between westerly winds and the Indian Monsoon over western China[J]. *Environment International*, 2019, 124: 294-301.
- [10] 谢蕾,章涛,孙红文. 全氟烷基化合物在人体肝脏中的富集特征及其与肝损伤的关系[J]. 环境化学, 2020, 39(6): 1479-1487.
- [11] 于南洋. 全氟化合物及典型异构体的暴露分析、代谢通路研究及甲状腺激素内稳态干扰风险评估[D]. 南京: 南京大学, 2015.
- [12] WANG J H, PAN Y T, CUI Q Q, et al. Penetration of PFASs across the blood cerebrospinal fluid barrier and its determinants in humans[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(22): 13553-13561.
- [13] LI J, CAI D, CHU C, et al. Transplacental transfer of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs): Differences between preterm and full-term deliveries and associations with placental transporter mRNA expression[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(8): 5062-5070.
- [14] LIU L Q, QU Y X, HUANG J, et al. Per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in Chinese drinking water: Risk assessment and geographical distribution[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2021, 33(1): 6.

编辑 葛晋