



戴安 (DIONEX) 园地

在线 SPE 固相萃取、HPLC/UV 检测
饮用水和瓶装矿泉水中酚类

酚类物质由于有致毒性而被规定为饮用水和矿泉水中的毒性污染物。欧盟饮用水指导原则规定饮用水和矿泉水中的酚类物质不高于 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，日本健康、劳动和福利部门规定饮用水中的酚类物质最高含量为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，美国 EPA 规定五氯(苯)酚最高含量为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ，并规定 11 种常见酚类物质作为美国 EPA 首要检测的污染物质。带有 UV/DAD、电化学检测器、荧光检测器的液相色谱可以对酚类物质进行检测。在线 SPE 固相萃取和 HPLC 相结合的技术，能解决传统 SPE 样品前处理方式的缺点，不需要购买大量 SPE 萃取柱和消耗大量的人力。戴安公司 Ultamate 3000 液相色谱开发出了大量先进液相色谱方法，例如二元液相，二维液相色谱和在线 SPE/HPLC。配备有大体积自动进样器的一台 Ultamate 3000 液相色谱仪，能够进行在线固相萃取，完成检测瓶装饮用水酚类物质。用二元泵阀切换技术可以替代大体积自动进样器也能做到在线 SPE 固相萃取。

本文阐述了在线 SPE 固相萃取方法，使用 HPLC/UV 检测美国 EPA 首要污染物名单中 11 种酚类物质，同时国际管理机构也要求使用该方法。该方法使用一根小的 IonPac NG1 反相聚合物浓缩柱来富集饮用水和瓶装水中的酚类物质，然后用植入极性基团的反相柱 the Acclaim PA 分析样品。这种全自动方法是检测饮用水和瓶装水中的酚类污染物非常经济的方法。

1 实验部分

EPA-604 方法酚类混标浓度 $2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶解于甲醇，组成成分：4 氯-3 甲酚，2 氯酚，2,4 二氯苯酚，2,4 二硝基苯酚，2,4 二甲基(基苯)酚，4,6 二氯-2 甲酚，2 硝基酚，4 硝基酚，五氯(苯)酚，苯酚和 2,4,6 三氯苯酚。标准品溶液制备基于 EPA-604 方法要求。

标准溶液储备液 1 用 5 mL 移液管分两次共添加 9.95 mL 甲醇于 10 mL 锥形瓶中后，移液枪加入 50 μL EPA-604 方法中混标 ($2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)，稀释后的标准储备液 1 浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

标准溶液储备液 2 用 5 mL 移液管将 900 μL 甲醇加至 10 mL 锥形瓶，然后用 250 μL 移液枪吸取 100 μL 标准溶液储备液 1 至该锥形瓶中，稀释后的标准储备液 2 的浓度为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

标准溶液 250 μL 移液枪分别将 50 μL 、100 μL 和 200 μL 的标准储备液 2 加到 3 个 100 mL 容量瓶中，0.2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MSA (含 5% 甲醇) 定容至刻度，标液浓度分别是 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

250 μL 移液枪分别将 50 μL 、100 μL 和 200 μL 标准储备液 1 加到 3 个 100 mL 容量瓶中，0.2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MSA (含 5% 甲醇) 定容至刻度。标液浓度分别是 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Dionex Ultamate 3000 HPLC 系统配置：DGP 3600M 双三元梯度泵；SRD 3600 溶剂架和内置脱气机；TCG-3200 柱温箱，带两个 6 通阀；VWD-3400 紫外可见波长检测器；ASHV 大体积进样器；工作站：变色龙 6.8

SPE 固相萃取 色谱柱：IonPac NG1, 5 μm , $4 \times 35 \text{ mm}$ (P/N 039567)；SPE 流动相 (左泵)：A. 0.2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MSA B. CH_3CN ；流速：清洗： $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ with 100% B；装样： $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ with 100% A；洗脱酚类物质：用 5% B, $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速洗脱；进样量：10 μL ；柱温：40 $^\circ\text{C}$ ；在线 SPE 总共运行时间 14 min

分析样品 色谱柱：Acclaim PA, 5 μm , $4.6 \times 150 \text{ mm}$ (P/N 061320)；流动相 (右泵)：A. 25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ HAc / 25 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ NH_4Ac (1.45 L V/V)；B. CH_3CN ；梯度条件：25 to 70% B in 17.5 min；流速： $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ；进样量 10 μL ；柱温：40 $^\circ\text{C}$ ；检测器：紫外波长 280 nm；总共分析时间为 18 min。在线 SPE 运行时，SPE 中色谱柱为下一次分析样品处于平衡状态。

2 结果与讨论

2.1 在线 SPE 方法优化

考察用不同浓度的酸 (HAc 或 MSA) 清洗标液，甲醇或乙腈有机溶剂洗脱 SPE 浓缩柱中酚类物质，结果显示酸 / 乙腈比酸 / 甲醇能产生更高的色谱峰，并且 0.2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ MSA / 乙腈清洗浓缩柱后，分析柱背景干扰最小。图 1 显示的是自来水样品重叠色谱图，不同浓度的乙腈洗脱 SPE 色谱柱，Acclaim PA 分析柱分析。当只用酸水冲洗去除杂质时，会产生更多的杂质和更高的背景 (较差的基线) (图 1A)。当用 20% 乙腈冲洗杂质时，杂质和背景会更低，但是洗脱出的酚类物质回收率会下降 (图 1D)，因此，15% 乙腈被选定为除去杂质的溶液，并且所有酚类物质回收率都较好 (图 1C)。

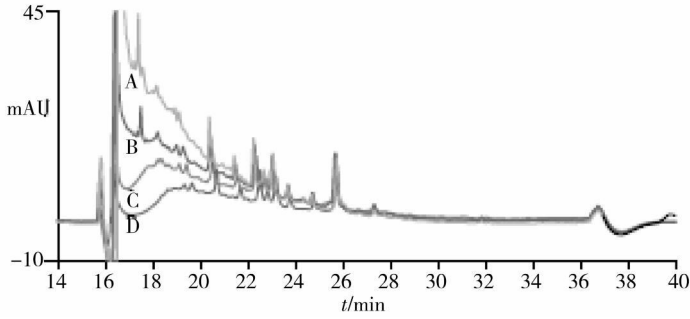


图 1 加标 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的自来水用不同浓度乙腈冲洗 IonPac NG1 SPE 浓缩柱后的重叠色谱图

A) 0%, B) 10%, C) 15%, D) 20%

2.2 流动相中酸的影响及流动相的选择

有多种酸液可作为流动相来分离酚类物质。如图 2 用甲磺酸 (MSA), 三氟乙酸 (TFA), 醋酸 (HAc) 或醋酸-醋酸铵 ($\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$) 可良好地分离酚类物质。

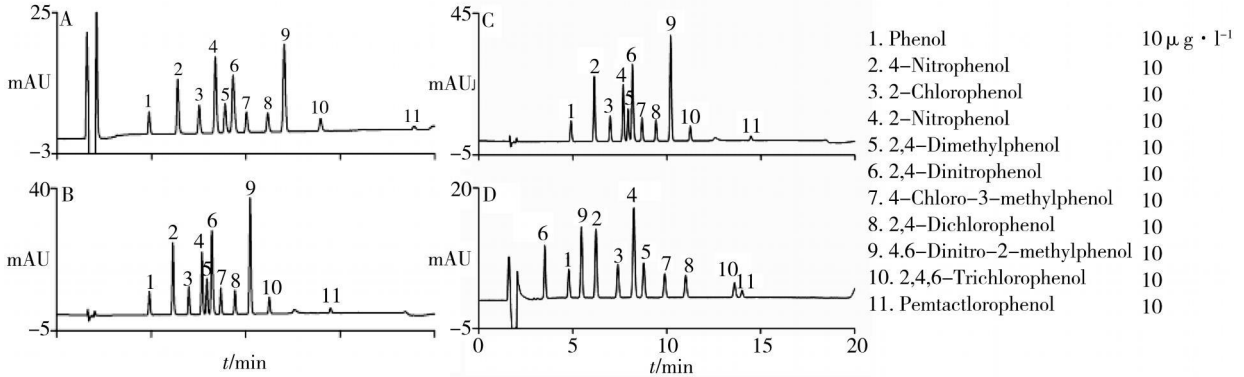


图 2 用不同酸液 (A 相), 乙腈 (B 相) 分离 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酚类色谱图

A) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MSA, B) 0.1% TFA, C) 0.1% HAc, D) $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$

流动相中酸浓度的改变对酚类物质保留时间的影响, 如图 3 所示, 大多数的酚类物质都发生了细微的变化, 不过也有少数酚类物质的保留因为流动相酸浓度改变而发生了明显变化。当 MSA 浓度 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,4-二硝基苯酚保留时间变化相当大, 4,6-二硝基-2-甲酚保留也稍微减少 (图 3A)。当 HAc 浓度由 0.03% 增加到 2.0%, 图 3B 显示出保留时间变化同 MSA 一致。将三氟乙酸替代醋酸后的结果也相似, 因此省去了这些数据。改变 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$ 缓冲液比例相比较酸液浓度改变, 更加会显著地影响 2,4-二硝基苯酚和 4,6-二硝基-2-甲酚的保留, 结果说明缓冲液对 2,4,6-三氯苯酚和五氯(苯)酚保留影响强于酸液浓度 (图 3C)。

醋酸, 甲磺酸和三氟乙酸溶液能较好的分离 U.S. EPA-604 方法规定的 11 个酚类物质。当由于 $\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$ 缓冲液能够有较好的分离度和重复性, 而被选择作为分析酚类物质的流动相。从图 3C 中能看出, 当使用 1.5:1 (V/V) 比例的 $\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$ 缓冲液后, 能预计所有的 11 种酚类物质都能够很好分离。

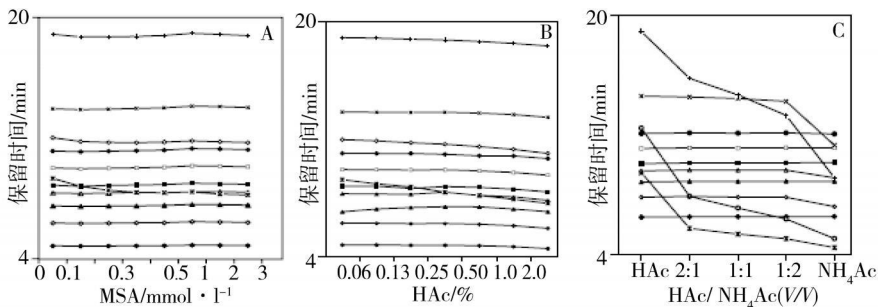


图 3 流动相浓度对保留时间影响

A) MSA 由 0.1 到 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, B) HAc 由 0.03 到 2.0%,

C) $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{HAc}/\text{NH}_4\text{Ac}$ 缓冲液由 100% HAc 到 100% NH_4Ac (V/V)。

2.3 重复性, 检测限和标准曲线

重复性通过连续 7 次进样 $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准溶液来进行考察, 保留时间和峰面积精确值, 酚类物质检测限见表 1, 在线 SPE-HPLC 检测限与 U. S. EPA604 中的 GC 色谱法检测限接近, 并且在大部分实例中要好于 GC 法, 而且省去了液-液萃取的繁琐操作, 手动 SPE 高成本. 酚类物质标准曲线由连续进样 6 个不同浓度的混标所得. EPA 604 采用外标法, 因此我们也采用外标法制做标准曲线和计算样品浓度. 表 1 数据同时列出了变色龙软件得出的标准曲线数据.

表 1 保留时间重复性, 峰面积重复性和 U. S. EPA 首要 11 种酚污染物检出限表

| 酚类 | 保留时间 | 峰面积 | 检测限 ^b | MDL($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | MDL($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | <i>r</i> | RSD (%) |
|-------------|----------------------|----------------------|---------------------------------------|--|--|----------|---------|
| | RSD ^a (%) | RSD ^a (%) | ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | GG-FID | GC-ECD | | |
| 2,4-二硝基苯酚 | 0.292 | 1.358 | 0.46 | 13 | 0.63 | 0.9998 | 1.73 |
| 苯酚 | 0.24 | 5.584 | 0.87 | 0.14 | 2.2 | 0.9984 | 4.29 |
| 4,6-二氯-2-甲酚 | 0.164 | 0.647 | 0.4 | 16 | ND | 0.9998 | 1.69 |
| 4硝基酚 | 0.155 | 0.432 | 0.42 | 2.8 | 0.7 | 0.9997 | 1.79 |
| 2-氯酚 | 0.122 | 1.659 | 0.41 | 0.31 | 0.58 | 0.9996 | 2.22 |
| 2硝基酚 | 0.092 | 1.487 | 0.41 | 0.45 | 0.77 | 0.9992 | 3.03 |
| 2,4-二甲(基苯)酚 | 0.089 | 0.462 | 0.3 | 0.32 | 0.68 | 0.9999 | 1.33 |
| 4-氯-3-甲酚 | 0.085 | 0.477 | 0.31 | 0.36 | 1.8 | 0.9998 | 1.42 |
| 2,4-二氯苯酚 | 0.072 | 0.731 | 0.08 | 0.39 | ND | 0.9998 | 1.33 |
| 2,4,6-三氯苯酚 | 0.056 | 0.717 | 0.2 | 0.64 | 0.58 | 0.9999 | 1.28 |
| 五氯(苯)酚 | 0.064 | 8.599 | 0.93 | 7.4 | 0.59 | 0.9965 | 6.07 |

a $2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准液 7 次进样; b 为 7 次进样峰面积单侧方差检验 (置信度 99%, $SD = 3.14$, $n = 7$) 来评估 MDL

2.4 样品分析

自来水和矿泉水中的酚类物质为达到较好的分离, 样品应先酸化至 pH 3.5 后分析, 图 4 表明水样分别 MSA 酸化至 pH 7 和 pH 3, 其中 2,4-二硝基苯酚, 4,6-二氯-2-甲酚, 4硝基酚 PH3 时的色谱峰型最好.

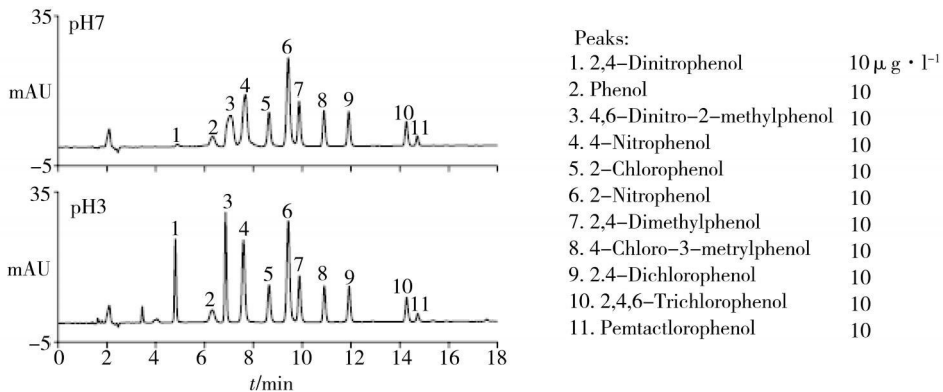


图 4 加标 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 后的瓶装矿泉水 1 样品 MSA 酸化后

对于不同水样, 酸度一般要求 $\text{pH} < 4.5$, 例如添加 $6 \mu\text{M}$ MSA (最后浓度约 $0.2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 至 500mL 蒸馏水样品溶液 (495mL 蒸馏水 + 5mL 甲醇) 中, 溶液 $\text{pH} 3.9$ 左右. 对于自来水和矿泉水样, 需要更多的 MSA, 由于这些水样富含大量能稀释掉 MSA 浓度的离子, 大部分是碳酸氢盐. 因此, 约 $56 \mu\text{M}$ MSA (最后浓度 $2 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 加到自来水和矿泉水中调节 pH 值范围 $2.5-4.5$.

2.5 瓶装矿泉水, 瓶装蒸馏水及自来水检测结果

两个品牌的瓶装矿泉水被分析, 结果在表 2 在矿泉水样品 2 中检测到两个低浓度的酚类成分, 矿泉水样品 1 中检测到一个低浓度的酚类成分. 11 个酚类成分加标回收率都良好. 蒸馏饮用水和该蒸馏水的加标样, 结果见表 3, 没有发现酚类物质在不加标的水样中, 并且回收率结果都比较好. 自来水结果总结见表 3, 低浓度的几个酚类物质被检出, 并且检测到的一些色谱峰的浓度甚至低于预计的检测限.

表 2 瓶装矿泉水回收率结果

| 酚类 | 瓶装矿泉水样 1 ^a | | | | 瓶装矿泉水样 2 ^b | | | |
|-------------|---|---|---|------|---|---|---|------|
| | 未加标 | 加标 | 含量 | 回收率 | 未加标 | 加标 | 含量 | 回收率 |
| | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | (%) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | (%) |
| 2,4-二硝基苯酚 | ND ^c | 10 | 9.44 | 94.4 | ND | 10 | 9.57 | 95.7 |
| 苯酚 | ND | 10 | 11.9 | 119 | 0.37 | 10 | 10 | 100 |
| 4,6-二氯-2-甲酚 | ND | 10 | 9.56 | 95.6 | ND | 10 | 9.57 | 95.7 |
| 4-硝基酚 | ND | 10 | 10.2 | 102 | ND | 10 | 10 | 100 |
| 2-氯酚 | ND | 10 | 10.4 | 104 | ND | 10 | 9.02 | 90.2 |
| 2-硝基酚 | ND | 10 | 11.9 | 119 | ND | 10 | 10.9 | 109 |
| 2,4-二甲(基苯)酚 | ND | 10 | 10.5 | 105 | ND | 10 | 9.97 | 99.7 |
| 4-氯-3-甲酚 | ND | 10 | 9.56 | 95.6 | ND | 10 | 9.4 | 94 |
| 2,4-二氯苯酚 | ND | 10 | 9.75 | 97.5 | ND | 10 | 9.05 | 90.5 |
| 2,4,6-三氯苯酚 | ND | 10 | 10.1 | 101 | 0.75 | 10 | 9.55 | 95.5 |
| 五氯(苯)酚 | 0.73 | 10 | 9.67 | 96.7 | ND | 10 | 9.6 | 96 |

a未加标水样 1进样 2次,加标水样进样 4次; b未加标水样 1进样 3次,加标水样进样 5次; cND: 没有检测到

表 3 蒸馏饮用水和自来水回收率结果

| 酚类 | 瓶装矿泉水样 1 ^a | | | | 瓶装矿泉水样 2 ^b | | | |
|-------------|---|---|---|------|---|---|---|------|
| | 未加标 | 加标 | 含量 | 回收率 | 未加标 | 加标 | 含量 | 回收率 |
| | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | (%) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) | (%) |
| 2,4-二硝基苯酚 | ND ^c | 5 | 4.95 | 99 | 2.11 | 15 | 10.4 | 70 |
| 苯酚 | ND | 5 | 4.84 | 96.8 | 0.41 | 15 | 14.2 | 94.7 |
| 4,6-二氯-2-甲酚 | ND | 5 | 5.02 | 100 | ND | 15 | 15.1 | 101 |
| 4-硝基酚 | ND | 5 | 5.09 | 102 | 0.8 | 15 | 15.2 | 101 |
| 2-氯酚 | ND | 5 | 5.22 | 104 | <MDL ^d | 15 | 11.5 | 76.7 |
| 2-硝基酚 | ND | 5 | 5.3 | 106 | ND | 15 | 14 | 93.3 |
| 2,4-二甲(基苯)酚 | ND | 5 | 5.19 | 104 | 1.63 | 15 | 15 | 100 |
| 4-氯-3-甲酚 | ND | 5 | 5.07 | 101 | <MDL | 15 | 14.5 | 96.4 |
| 2,4-二氯苯酚 | ND | 5 | 4.98 | 99.6 | ND | 15 | 14.1 | 94 |
| 2,4,6-三氯苯酚 | ND | 5 | R | 104 | 0.65 | 15 | 14.6 | 97 |
| 五氯(苯)酚 | ND | 5 | 4.99 | 99.8 | 1.13 | 15 | 14.2 | 94.5 |

a未加标蒸馏水进样 5次,加标样品进样 4次; b未加标自来水进样 2次,加标样品进样 5次; cND未检测到; d<MDL= 低于检测限

3 结论

在线 SPE 和二元 Ultramate 系统能检测 EPA 首要污染物名单 11 种酚类,而不需要人工离线进行样品前处理. 在线 SPE 和 UV 检测检测结果具有良好的重复性,并且检出限与 GC 法接近,甚至很多例子的检出限要优于 EPA-604 的 GC 法.