

正相高效液相色谱法分离检测 壬基酚和短链壬基酚聚氧乙烯醚

刘 欣¹ 谷明生² 河合富佐子^{*2}

¹ (辽宁师范大学城市与环境学院, 大连 116029) ² (日本冈山大学资源生物科学研究所, 日本仓敷 7100046)

摘 要 建立了一种以正相高效液相色谱等强度洗脱分离检测壬基酚和短链壬基酚聚氧乙烯醚的新方法。采用 Cosmosil 5SL-II (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) 色谱柱, 以乙酸乙酯-乙醇为流动相, 流速 1.0 mL/min, 281 nm UV 检测, 在 10 min 内可分离检测 *p*-壬基酚以及短链壬基酚聚氧乙烯醚混合物的 3 种主要组分。运用本方法对 NP, NPnEO ($n=1\sim3$) 进行测定的相对标准偏差分别为 1.4%、1.6%、2.5% 和 1.4%; 检出限分别为 0.1 mg/L (NP) 和 0.5 mg/L (NPnEO), 重复性好且灵敏度高。

关键词 高效液相色谱, 壬基酚, 短链壬基酚聚氧乙烯醚

1 引 言

水体及水环境沉积物中存在的壬基酚 (nonylphenol, NP) 及含有 1~3 个氧乙烯基的短链壬基酚聚氧乙烯醚 (nonylphenol monoethoxylate, NPEO; nonylphenol diethoxylates, NP2EO) 是由被广泛用于日用及工业的洗涤剂壬基酚聚氧乙烯醚 (nonylphenol polyethoxylates) 在污水处理场及水体中自然降解而形成的难降解中间物。由于它们除了被发现比母体的毒性更大^[1] 以外, 还被发现具有弱的雌性激素活性^[2], 近年来逐步引起研究者的关注。关于环境样品中壬基酚及相关化合物的分离富集与测定, 巢静波等^[3] 作了较为详尽的评述; 目前通常采用气相色谱-质谱联用, HPLC 以氨基硅烷柱配合梯度洗脱以及反相 HPLC 配合苯基硅烷柱^[4] 来测定这几种物质; 邵兵等^[5] 利用正相分析柱反相流动相梯度洗脱方法能够同时分离检测 NPnEO ($n>1$)。本研究利用普通未键合硅胶色谱柱, 在正相液相色谱条件下等强度洗脱分离测定壬基酚及含有 1~3 个氧乙烯基的短链壬基酚聚氧乙烯醚, 探索建立一种快速、简单、重复性好、灵敏度高的常规检测方法。本方法在实际应用中取得了令人满意结果。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂和样品

Tosoh 8020 型高效液相色谱系统 (包括全波长紫外检测器及数据处理软件) (日本 Tosoh 公司)。流动相溶剂: 乙酸乙酯、乙醇、正己烷和二氯甲烷, 均为 HPLC 级。标准样品 *p*-壬基酚 (NP) 购于日本 Nacalai Tesque 公司, 短链壬基酚聚氧乙烯醚 (NPEO_{av2}) 由日本日光化学公司提供 (其中含 NPEO 27.71%、NP2EO 40.15%、NP3EO 17.99%、NP4EO 6.14% 和 NP5EO 1.84%; 乙氧基的平均聚合度为 2)。实际样品采用本实验室所进行的 NPEO_{av2} 降解实验最终产物的常规萃取物。

2.2 色谱分离条件

色谱柱: Cosmosil 5SL-II Waters (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, 日本 Nacalai Tesque 公司); 流动相: 乙酸乙酯-乙醇 = 95:5 (V/V); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 30°C; 紫外检测波长: 281 nm。

2.3 标准溶液的配制

称取适量标准样品, 用流动相溶液配制成 1% 母液, 再逐步稀释得到不同浓度的标准溶液; NPEO、NP2EO 和 NP3EO 的标准溶液浓度需要按照各自在混合物中所占的百分比进行换算。

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

2004-06-06 收稿; 2004-07-22 接受

按照 Cosmosil 5SL-II Waters 分析柱产品说明书的建议,采用 95%正己烷及 5%乙醇为流动相成功分离了二甲苯、肉桂醇和硝基苄醇。由于壬基酚呈弱酸性,短链壬基酚聚氧乙烯醚为非离子性物质,因此,实验对流动相溶剂的选择主要从筛选与非极性溶剂正己烷相配合的非定位溶剂二氯甲烷或者非碱性定位剂乙酸乙酯以及质子供体乙醇来进行,结果见表 1。可见,80%乙酸乙酯与 20%乙醇所组成的流动相所得到的容量因子较小,主要标的峰的理论塔板数较高,实验选定以此溶剂作为流动相。

表 1 流动相组成成分的筛选

Table 1 Screening of the ingredient of mobile phase

流动相组成 The ingredient of mobile phase	标的峰保留值区间 The range of retention time of objects (min)	标的峰塔板数 Theoretical plate number of objects			
		NP	NPEO	NP2EO	NP3EO
正己烷 Hexane 80% 二氯甲烷 Dichloromethane 20%	$7 < t < 31$	736	983	901	866
正己烷 Hexane 80% 乙酸乙酯 Ethyl acetate 20%	$6 < t < 21$	835	1606	1549	1575
乙酸乙酯 Ethyl acetate 乙醇 Ethanol 20%	$3 < t < 4.5$	22120	15419	3953	8201

NP: nonylphenol; NPEO: nonylphenol monethoxylate; NP2EO: nonylphenol diethoxylate; NP3EO: nonylphenol triethoxylate

3.2 流动相溶剂的优化

由于在上述所确定的流动相条件下,容量因子比较接近也比较低,所以分离度不好。实验又对该流动相进行了优化,优化主要从调节质子供体乙醇的比例来进行,结果见表 2。从表 2 可以发现,增加乙

表 2 流动相各组分的比例对分离的影响

Table 2 The effect of the ratio of mobile phase on separation

流动相组成 The ingredient of mobile phase	标的峰保留值区间 The range of retention time of objects (min)	标的峰塔板数 Theoretical plate number of objects				最小分离度 The minimum separation factor
		NP	NPEO	NP2EO	NP3EO	
乙酸乙酯 Ethyl acetate 90%, 乙醇 Ethanol 10%	$3 < t < 5$	13780	7458	8758	8938	1.198
乙酸乙酯 Ethyl acetate 95%, 乙醇 Ethanol 5%	$3.25 < t < 5.5$	17912	7629	20925	22551	1.263
乙酸乙酯 Ethyl acetate 100%, 乙醇 Ethanol 0%	$3.5 < t < 8$	7881	8596	30750	4366	1.803

醇比例可以使壬基酚及短链壬基酚聚氧乙烯醚的保留值降低,缩短了分离时间,但却使疏水性强的 NP、NPEO 与 NP2EO 分离度降低。当乙酸乙酯的比例为 100% 时,虽然各个主要样品峰能达到基线分离(最小分离度为 1.8),但却使疏水性较弱的 NP5EO 在分析柱上的保留性加强,导致峰展宽,峰高降低,以至于检测不到,而 NP4EO 峰的保持时间大于 13 min。当乙醇比例为 5% 和 10% 时,各个样品组分基本能够达到基线分离(最小分离度分别为 1.263 和 1.198),且标的样品(NP、NPnEO, $n=1\sim3$) 峰的保持时间都在 5 min 以内(见图 1);但考虑到在添加 5% 的乙醇条件下能够得到更高的柱效,所以确定流动相中乙醇的比例为 5%。

分别对 NP、NPEO、NP2EO 和 NP3EO 从波长 195~360 nm 范围的扫描,发现它们都在 281 nm 处有最大吸收值,所以确定对它们的检测和定量计算都在此波长条件下进行。

3.3 方法的线性范围、检出限和精密度

将各样品不同浓度的标准溶液在上述色谱条件下分别进行分析,由回归分析得到这几种组分的校正曲线(见表 3);以 3 倍信噪比求出检出限(最低检出浓度),根据进样量为 10 μ L,计算出最小检出量。由表 3 可见,这几种物质的峰面积与浓度有良好的相关性;另外,在用紫外检测器的条件下,本实验所能够达到的检出限也比较理想。本方法测定短链壬基酚聚氧乙烯醚的精密度高,重复性好。

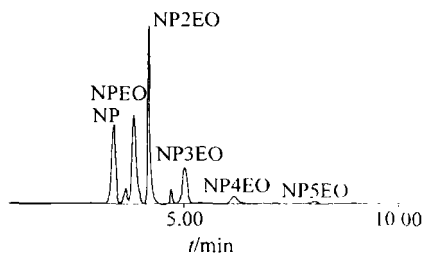


图 1 壬基酚及短链壬基酚聚氧乙烯醚混合物的分离色谱图

Fig 1 Chromatogram of NP and NPnEO ($n=1\sim5$) mixture

表 3 NP 及 NPnEO 的校正曲线的回归分析及检出限 (n = 1~3)
Table 3 Regression analysis of calibration curves and detection limit of NP and NPnEO (n = 1~3)

标准样品 Standard sample	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient r	线性范围 Linear range (mg/L)	检出限 Detection limit (mg/L)	最小检出量 Minimum amount of Detection (ng)	RSD (n = 5, %)
NP	Y = 5.03X + 5.569	0.9982	1~100	0.1	1	1.4
NPEO	Y = 5.427X + 29.16	0.9974	1~50	0.5	5	1.6
NP2EO	Y = 4.207X + 36.98	0.9991	2~100	0.5	5	2.5
NP3EO	Y = 3.957X + 15.62	0.9983	2~100	0.5	5	1.4

Y: 峰面积 (peak area); X: 浓度 (concentration), mg/L。

3.4 实际样品的分析

在本实验室对短链壬基酚聚氧乙烯醚进行生物降解的体系中,所添加的 NPEO_{av2} 初始浓度为 200 mg/L。经过 10 d 的反应后进行常规萃取,萃取物以流动相溶剂进行溶解。最后在上述色谱条件下进行加样分析,所得结果列于表 4。实验结果表明,该方法定量准确,简便高效。

表 4 实际样品测定结果 (n = 3)
Table 4 Analytical results of samples (n = 3)

样品 Sample	分析物 Analyte	加入量 Added (mg/L)	测得量 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%)
10 d 后反应终产物 The products after 10-day reaction	NPEO	0	102.4	103.6
		5.5	108.2	
	NP2EO	0	8.6	101.2
		8.0	16.7	
	NP3EO	0	3.6	101.1
		3.6	7.3	

References

1 Hall W S, Patoczka J B, Mirenda R J, Porter B A, Miller E. *Arch Environ. Contam. Toxicol* **1989**, 18(5): 765~772
2 Soto A M, Justicia H, Wary J W, Sonnenschein C. *Environ Health Prospect*, **1991**, 92(5): 167~173
3 Cao Jingbo (曹静波), Liu Jingfu (刘景富), Wen Meijuan (温美娟), Liu Jiem in (刘杰民), Jiang Guibin (江桂斌). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2002**, 30(7): 875~879
4 Kojima S, Watanbe M. *Journal of Japan Society on Water Environment*, **1998**, 21(5): 302~309
5 Shao Bing (邵兵), Hu Jianying (胡建英), Yang M in (杨敏). *Environmental Chemistry* (环境化学), **2001**, 20(6): 600~605

Determination of Nonylphenol and Short Ethoxy Chain Nonylphenols on a Normal Phase Silica-gel Column High Performance Liquid Chromatography

Liu Xin¹, Akio Tan², Fusako Kawai^{*2}

¹ (School of Urban and Environmental Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029)
² (Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 7100046 Japan)

Abstract High performance liquid chromatography (HPLC) on a normal phase silica-gel column with isocratic elution method was established to determine nonylphenol (NP) and short ethoxy chain nonylphenols (NPnEO, n = 1~3). NP and NPnEO were separated on a Cosmosil packed column 5SL-II (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) using ethyl acetate-ethanol as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and detected at 281 nm. Within 10 minutes all of the target compounds were eluted and separated. The limit of detection for NP and NPnEO (n = 1~3) were 0.1 mg/L and 0.5 mg/L (n = 1~3) respectively. The relative standard deviations of NP, NPEO, NP2EO and NP3EO were 1.4%, 1.6%, 2.5% and 1.4%, respectively.

Keywords High performance liquid chromatography, nonylphenol, short ethoxy chain nonylphenols

(Received 6 June 2004; accepted 22 July 2004)