

Subzero-Temperature Liquid-Liquid Extraction of Phenols for High-Performance Liquid Chromatography

Hongyi Zhang, Lihui Zhang, Shasha Li

College of Chemistry and Environmental Science, Hebei University, Baoding, China

Email: hyzhang@hbu.edu.cn

Abstract: For high-performance liquid chromatography of phenols, subzero-temperature extraction technique using hydrophilic acetonitrile as a solvent was applied to the extraction of phenols such as phenol, 4-nitrophenol, 2-nitrophenol, 2,4-dimethylphenol and bisphenol A from water samples. After the factors influencing extraction had been investigated, the optimal extraction conditions were determined as follows: 3.5ml of water, 2.0 mL of acetonitrile, pH at 4.5, 30 min of extraction time, and -30 °C of extraction temperature. The recovery rate of the target analyte was between 96.5 % ~ 116.2 %. The detection limits of phenol, 4-nitrophenol, 2-nitrophenol, 2,4-dimethylphenol and bisphenol A were 0.0157, 0.0005, 0.0008, 0.0060 and 0.0050 µg/ml, respectively. As acetonitrile is used as the extraction solvent, this extraction method is suitable for mass spectrometer detection, and much lower detection limits for the selected phenols would be expected.

Keywords: HPLC; subzero-temperature; liquid-liquid extraction; phenols

超低温液-液萃取-高效液相色谱测定水中酚类化合物

张红医, 张立会, 李莎莎

河北大学化学与环境科学学院, 保定, 中国, 071002

Email: hyzhang@hbu.edu.cn

摘要: 建立了超低温液-液萃取-高效液相色谱测定水中苯酚、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的分析方法。在最佳条件下, 即水相 pH 值为 4.5, 温度为 -30 °C, 乙腈体积为 2 ml, 水相体积为 3.5 ml, 超低温萃取时间为 30 min, 测得保定自来水和北京自来水中五种酚类化合物均低于检出限, 回收率为 96.5 % ~ 116.2 %。方法对苯酚、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的检出限分别为: 0.0157、0.0005、0.0008、0.0060 和 0.0050 µg/ml。由于采用乙腈作为萃取剂, 非常适合于质谱检测器, 因此有望实现对这些酚类物质更低的检测限。

关键词: 高效液相色谱; 超低温; 液-液萃取; 酚类

1 引言

酚类化合物是一类有毒的化学物质, 危害较大。含酚废水是环境中水污染的重要来源。它危害大、污染范围广。目前分析酚类化合物的方法有: 分光光度法、气相色谱法和高效液相色谱法等。高效液相色谱法由于对各种不同取代基的酚类化合物可以同时进行分离和分析, 并且具有重现性好、选择性好、灵敏度高、操作简便的优点, 越来越受到重视。

低温液-液萃取^[1-2]是近年来出现的一种新的样品处理技术。由于其采用乙腈作为萃取剂, 可以很好地与液相色谱流动相相适应。本文详细讨论了影响乙腈

资助信息: 国家自然科学基金面上项目(No. 20875020)

低温液-液萃取法萃取水中酚类物质的实验因素(水相 pH、水相体积、萃取温度及萃取时间), 并在最佳条件下测定了水中苯酚、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 含量。本文所建立的萃取方法如果与质谱检测器一起使用会进一步降低检出限。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

高效液相色谱仪(LC-20AD, Shimadzu, 岛津公司)配紫外检测器, 7725i 手动进样阀(美国); C18 色谱柱(250mm × 4.6mm, 5µm, Atlantis); 色谱柱恒温箱(AT-330, 天津市奥特赛恩斯仪器有限公司); 超低温

冷冻储存箱 (DW-FL90, 中科美菱低温科技有限责任公司) ; 试剂均为分析纯。

2.2 实验方法

将 2 ml 乙腈和 3.5 ml 的水样置入 10 ml 塑料离心管中, 漩涡震荡 1 min, 在-30°C 下冷冻 30 min。乙腈相经 0.45 μm 有机滤膜过滤, 进样 5 μl。

2.3 色谱条件

流动相为 $V(\text{甲醇}) : V(\text{水}) = 55 : 45$ 的甲醇水溶液; 进样量: 5 μl; 流速: 0.60 ml/min; 检测波长 285 nm; C18 色谱柱(250mm×4.6mm, 5 μm, Atlantis); 柱温: 36°C。

3 结果与讨论

本实验在低温下, 以 2 ml 乙腈为萃取溶剂, 10 μg/ml 的 5 种酚 (苯酚, 4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A) 的标准溶液为例研究了水相 pH 值、水相体积、低温萃取温度及萃取时间对萃取效率的影响。

3.1 水相 pH 值的影响

用 2 mol/L 盐酸及 1 mol/L 氢氧化钠, 将 10 μg/ml 标准溶液的 pH 值调为 2.5、3.5、4.5、5.5、6.5 和 7.5。固定乙腈 2 ml 与 2 ml 的上述不同 pH 的标准溶液均匀混合。在-30 °C 下冷冻 30 min, 上层乙腈相经 0.45 μm 有机滤膜过滤, 进样 5 μl。在考察的酸度范围内, 各个酚类物质的萃取 (除 2-硝基苯酚外) 基本不受水相 pH 的影响, 而 2-硝基苯酚在 pH=4.5 时达到最大值。故取 pH 4.5 为最佳。

3.2 水相体积对萃取效率的影响

乙腈固定为 2 ml, 分别取 pH 为 4.5 的 10 μg/ml 的标准溶液 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 和 5.0 ml, 漩涡震荡 1 min。低温-30 °C 下冷藏 30 min, 取上层乙腈相过 0.45 μm 有机滤膜, 进样 5 μl。实验数据如图 1 所示。

由图 1 水相体积对萃取效率的影响 可以看出, 当水相体积在 2.0 ml~3.5 ml 时, 2-硝基苯酚、4-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的峰面积随水样体积的增大而增大; 在水相体积为 3.5 ml~4.5 ml 时, 2-硝基苯酚、4-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的峰面积随水样体积的增大而减小; 4.5~5.0 ml 时, 乙

腈对 5 种酚的萃取量比较稳定, 不随水样体积的增大而增大。乙腈对苯酚的萃取量也随体积的变化有相应的改变, 只是变化幅度不大; 故选 3.5 ml 为最佳水相体积。

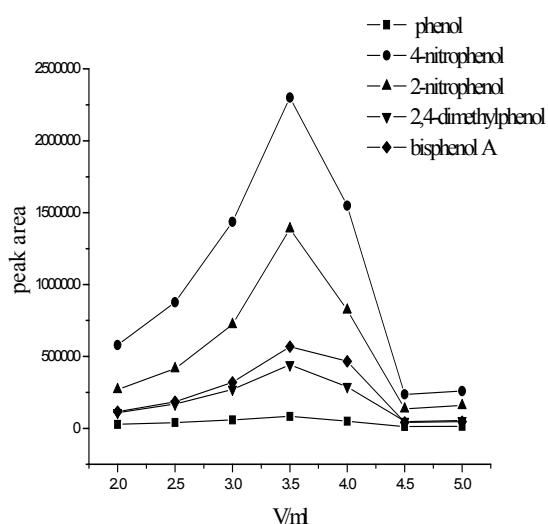


Figure 1. Effect of volume of aqueous phase on extraction efficiency
图 1. 水相体积对萃取效率的影响

3.3 低温萃取温度对萃取效率的影响

乙腈固定为 2 ml, 取 pH 为 4.5 的 10 μg/ml 标准溶液 3.5 ml。分别在-15、-20、-25、-30、-35 和-40 °C 下萃取 30 min, 取上层乙腈相过 0.45 μm 有机滤膜, 进样 5 μl。实验数据如图 2 所示。

由图 2 萃取温度对萃取效率的影响 可以看出, 当-15 °C 到-20 °C 时, 乙腈对 4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、双酚 A 及 2, 4-二甲基苯酚的萃取量稳定; 从-20 °C 到-30 °C 乙腈对这 4 种酚的萃取量明显升高, 在-30 °C 时达到最大值; -30 °C 到-35 °C 乙腈对这 4 种酚的萃取量明显减小; -35 °C 到-40 °C 时乙腈对这 4 种酚的萃取量趋于稳定。从-15 °C 到-40 °C 的范围内, 乙腈对苯酚的萃取量也有相应的变化, 只是变化不明显, 受温度影响不大。因此选取-30 °C 为最佳低温萃取温度。

3.4 超低温萃取时间对萃取效率的影响

固定乙腈 2 ml, 取 pH 为 4.5 的 10 μg/ml 的标准溶液 3.5 ml。在-30 °C 下萃取时间分别 15、20、25、30、35、40 和 50 min。取上层乙腈相过 0.45 μm 有机滤膜过滤, 进样 5 μl。实验数据如图 3 所示。

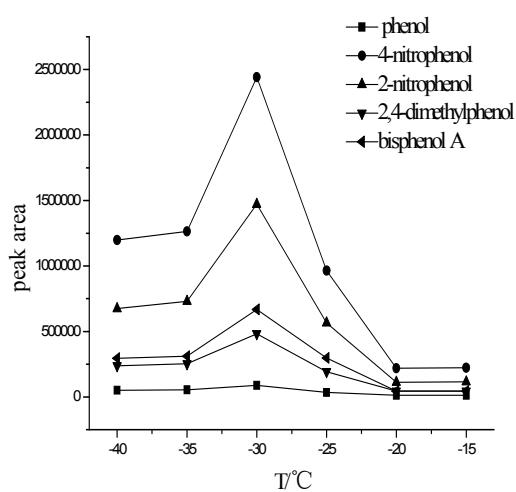


Figure 2. Effect of extraction temperature on extraction efficiency

图 2. 萃取温度对萃取效率的影响

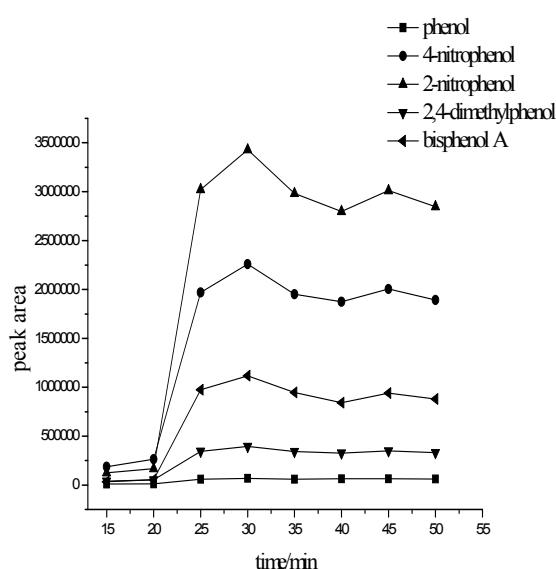


Figure 3. Effect of extraction time on extraction efficiency

图 3. 萃取时间对萃取效率的影响

图 3 为萃取时间对萃取效率的影响, 由图可以看出, 当萃取时间从 15 min 到 20 min 变化时, 乙腈对 2-硝基苯酚、4-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的萃取量比较稳定; 20 min~30 min 时, 乙腈对 2-硝基苯酚、4-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的萃取量明显增大; 30 min 之后乙腈对 2-硝基苯酚、4-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的萃取量趋于稳定; 在低温萃取时间在 15 min~50 min 的范围内, 乙腈对

苯酚的萃取量也随萃取时间有相应的变化, 只是变化不明显; 故取 30 min 为最佳萃取时间。

3.5 方法线性范围、检出限和精密度

在最佳条件下, 即水相 pH 值为 4.5, 温度为 -30°C, 乙腈体积为 2 ml, 水相体积为 3.5ml, 超低温萃取时间为 30 min, 苯酚、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 的标准曲线及精密度如下。图 4 为标准色谱图。

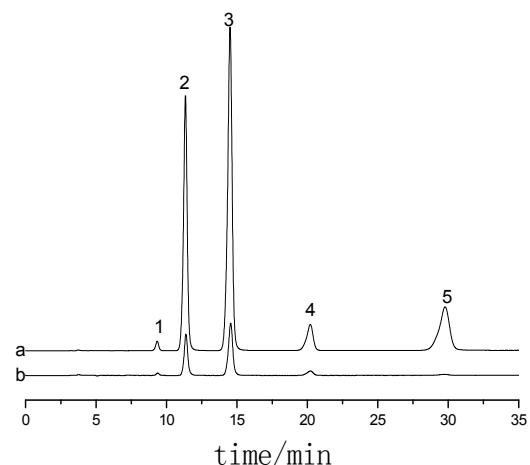


Figure 4. Typical chromatograms

图 4. 标准色谱图

a. 为最佳条件下, 乙腈萃取的 10 μ g/ml 标准溶液的色谱图;

b. 为未经过乙腈萃取的 10 μ g/ml 标准溶液的色谱图。

1. phenol;2. 4-nitrophenol;3. 2-nitrophenol;

4. 2,4-dimethylphenol;5. bisphenol A

3.5.1. 标准曲线的绘制及检出限

在最佳条件下, 采用 0.5 μ g/ml、1.0 μ g/ml、5.0 μ g/ml、10.0 μ g/ml 和 20.0 μ g/ml 的标准液做苯酚、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯酚和双酚 A 标准曲线, 如表 1 所示。

3.6 样品分析及加标回收率

在最佳条件下, 即水相 pH 值为 4.5, 温度为 -30°C, 乙腈体积为 2 ml, 水相体积为 3.5ml, 超低温萃取时间为 30 min, 测定了保定市及北京市自来水中的五种酚类化合物, 其含量均低于本方法的检出限。五种酚类化合物的加标回收率见表 2。

Table 1. Regression equation, linear range, reproducibility and detection limit**表 1. 回归方程、线性范围、重现性及检出限**

酚类	回归方程	相关系数 (r)	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	相对标准偏差 (%, n=5)
苯酚	$Y = 803.74455 + 7778.64321 X$	0.9992	0.5-20	0.0157	4.219
4-硝基苯酚	$Y = -1153.80626 + 225040.91958 X$	0.9999	0.5-20	0.0005	3.335
2-硝基苯酚	$Y = 8920.92347 + 130835.97395 X$	0.9996	0.5-20	0.0008	2.732
2, 4-二甲酚	$Y = 1961.36464 + 41657.66877 X$	0.9997	0.5-20	0.0060	3.365
双酚 A	$Y = -8470.80241 + 54866.20672 X$	0.9998	0.5-20	0.0050	2.855

Table2. Recovery (%) of samples**表 2. 五种酚类化合物的回收率 (%)**

样品	加标量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	苯酚	4-硝基 苯酚	2-硝基 苯酚	2, 4- 二甲基 苯酚	双酚 A
保定市自来水	5	102.0	98.4	110.4	103.3	100.7
	10	96.5	99.5	116.2	105.6	111.1
北京市自来水	5	99.0	99.5	111.0	103.5	106.7
	10	102.8	104.2	102.1	104.1	107.4

4 结论

本实验采用超低温液-液萃取-高效液相色谱法测定水中苯酚、4-硝基苯酚、2-硝基苯酚、2, 4-二甲基苯

酚和双酚 A。这种萃取方法采用乙腈作为萃取剂，不仅萃取液与液相色谱的流动相相匹配，不会出现明显的萃取剂峰，而且也非常适合质谱检测。另外，这种萃取方法本身也起到了富集的作用，如果采用质谱检测器可获得更低的检出限。

致 谢

本论文是在国家自然科学基金项目（项目号：No. 20875020）资助下完成的。

References (参考文献)

- [1] Manabu Yoshida and Atsushi Akane .Subzero-Temperature Liquid-Liquid Extraction of Benzodiazepines for High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1999, 71, 1918-1921
- [2] Manabu Yoshida, Atsushi Akane, Mayumi Nishikawa, Toshimitsu Watabiki, and Hitoshi Tsuchihashi. Extraction of Thiamylal in Serum Using Hydrophilic Acetonitrile with Sub-zero-Temperature and Salting-Out Methods. *Anal. Chem.* 2004, 76, 4672-4675