

青紫泥中五氯酚的超声萃取-液相色谱法测定

王兆炜, 林琦, 金海峰, 王冬

(浙江大学华家池校区环境工程系, 浙江 杭州 310029)

摘要:研究了超声萃取结合高效液相色谱技术在青紫泥五氯酚残留分析测定中的应用,包括不同提取剂(乙腈、二氯甲烷)和反应体系酸度及提取时间、温度对微波提取效率的影响。结果表明,超声萃取结合高效液相色谱技术可以实现青紫泥中五氯酚残留的快速、有效、准确分析。对于青紫泥中五氯酚的超声萃取-高效液相色谱测定方法,以乙腈作为提取剂,加 0.045 mol·L⁻¹ 的硫酸酸化,振荡 30 min,40℃超声萃取 60 min,可以得到 87%~108%的回收率。将供试青紫泥样品风干、磨细可以较鲜土获得更好的超声萃取效果,使一次超声提取合理、且可行。

关键词:超声萃取; 液相色谱; 青紫泥; 五氯酚

中图分类号:X839.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)06-1249-05

Determination of Pentachlorophenol in Qingzi Soil by High Performance Liquid Chromatography with Ultrasound Assisted Extraction

WANG Zhao-wei, LIN Qi, JIN Hai-feng, WANG Dong

(Department of Environmental Engineering, Huajiachi Campus, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Pentachlorophenol (PCP) is a widely used antiseptic, pesticide in the world. It can cause potential mutation on people as well as other living organisms. To establish a convenient, credible, practical method to determine PCP in contaminated soil is of great importance to study both the fate and the remediation technology in environment. In this paper, ultrasound assisted extraction and high performance liquid chromatography analysis was developed to measure PCP residual in Qingzi soil. The results showed that PCP recovery for the method was depended on various extracting reagents, extracting time and pH, temperature in the extracting system. Due to the lower pKa of PCP (4.93), acidifying soil with H₂SO₄ can improve recovery efficiently, especially using acetonitrile as extraction reagent. In addition, relative higher temperature and longer extracting time were also benefit to the extraction. It may be suggested that the method using acetonitrile as extraction reagent, adding 0.045 mol·L⁻¹ H₂SO₄ to acidify, and then ultrasonic radiating for 60 min under 40℃ after vibrating for 30 min be optimized, gaining PCP recovery up to 87%~108%. Besides, we confirmed that air-dried, ground soil was in favor of extraction rather than fresh soil when determining the PCP residual in long-term contaminated soil.

Keywords: ultrasound assisted extraction; high performance liquid chromatography; Qingzi soil; pentachlorophenol

五氯酚(pentachlorophenol, PCP) 及其钠盐是一种目前仍在全世界范围内普遍且大量采用的防腐剂、杀虫剂和除莠剂^[1,2]。五氯酚对人体和环境生物会产生潜在的致突变效应,进入到环境中的五氯酚对人体以及其他生物均具有较强毒性,对水生生物的半致死量(LD₅₀)一般为 0.32~0.77 mg·L⁻¹,水体中五氯酚含量达 0.1~0.2 mg·L⁻¹ 即可使鱼死亡。五氯酚的化学稳定性使得其残留不易消失,一旦散布在环境中将造成长期的污染,许多国家发现土壤、沉积物受五氯酚污染^[3-5]。

美国 EPA 的一些相关研究报道表明,有 80% 的人尿样中检测到五氯酚的存在^[6]。很多国家如美国、日本和中国等都将五氯酚列入优先污染物名单^[7]。

准确而迅速地分析测定土壤中五氯酚的残留量,对研究五氯酚在土壤中的归趋、监测并控制生物圈中五氯酚的含量,保证农产品安全有着重要意义。由于土壤的特异性,目前还没有公认的标准方法用于土壤中 PCP 的分析。近年来,对于土壤中五氯酚残留量的分析、测定,人们进行了种种探索^[8-14],各种不同的研究都集中于对不同前处理与测试方法的探讨。在国内,孙磊等应用超声波萃取、乙酸酐衍生化和气相色谱/电子捕获检测器(GC/ECD)测定红壤中痕量五氯酚^[8],该法的回收率为 89%~101%。吴坤等在藏红 T 分

收稿日期:2005-02-01

基金项目:“863”青年基金(2002AA649200)

作者简介:王兆炜(1978—),男,甘肃武威人,硕士研究生,主要从事环境污染模拟与控制方向研究。

联系人:林琦 E-mail: Linqi@zju.edu.cn

光光度法的基础上,用蒸馏法直接提取土壤中的五氯酚进行测定^[15],效果较好。国内外有关土壤中 PCP 的高效液相色谱技术的分析多在对不同前处理方法的探讨上^[1,10,13,16,17]。在国外,曾报道加拿大化工部的 C. Barbeau L Deschenes 等用亚甲基氯化物提取土壤中的五氯酚,再将五氯酚转移到甲醇中然后用 HPLC 来测定五氯酚含量^[18],试验获得了较为理想的回收率。但对于超声萃取结合高效液相色谱技术在土壤五氯酚分析测定中的应用鲜有研究与报道。

超声波具有聚束、定向、反射、投射等特性,作用于液液、液固两相、多相体系、表面体系以及膜界面体系会产生一系列的物理、化学作用并在微环境内产生各种附加效应。由于这种特性,超声波萃取技术作为一种有效手段在多种环境样品分析的前处理中被广泛研究和使用的^[19,20]。本文以青紫泥为研究对象,探讨了超声萃取结合高效液相色谱技术在青紫泥中五氯酚残留分析测定中的应用,包括不同提取剂(乙腈、二氯甲烷)以及反应体系酸度及提取时间、温度对微波提取效率的影响,以期为准确而迅速地分析测定土壤中五氯酚的残留,研究五氯酚在土壤中的归趋、监测并控制生物圈中五氯酚的含量,提供新的手段和方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.3 试验设计

1.3.1 污染土壤样品的制备

称风干土样 50.00 g 于培养皿中,向其中加入 100 mg·L⁻¹ 五氯酚的甲醇标准溶液,使土壤中五氯酚的浓度为 50 mg·kg⁻¹。待溶剂挥发后,加入 15 mL 的蒸馏水,保持 30%的含水量,用铝箔封口用于防止水分蒸发,在培养箱中 25℃闭光培养 24 h。此土样用于五氯酚回收率研究。

1.3.2 五氯酚萃取条件的选择

- (1)选择乙腈、二氯甲烷作为供试萃取剂。
- (2)萃取酸度选择:设置 9.0、4.5、0.45、0.045、0 mol·L⁻¹ 硫酸 5 个酸化浓度,在 9.0、4.5、0.45 mol·L⁻¹ 3 个浓度下将萃取上清液样品浓缩至正己烷中过 0.45 μm 滤膜后测定(以保护分析检测系统),其余 0.045、

高效液相色谱(HPLC),Agilent1100 系列,美国安捷伦公司;KQ-250E 型医用超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;RE-52AAA 旋转蒸发器,上海嘉鹏仪器科技有限公司;SHB-ⅢA 循环式多用真空泵,河南省太康县教材仪器厂;Biofuge stratos 离心机,德国科峻仪器公司;HZ-9211K 恒温振荡器,太仓市科教器材厂;岛津 UV-1206 紫外分光光度仪。其他常规仪器。

五氯酚(PCP),基本理化性质见表 1,纯度 98.5%,上海试剂一厂;甲醇,一级色谱纯,天津市四友生物医学技术有限公司;乙腈,色谱纯,浙江临海市浙东特种试剂厂;二氯甲烷,分析纯,浙江杭州双林化工试剂厂;正己烷,分析纯,杭州炼油厂;浓硫酸,分析纯,衢州巨化试剂有限公司;丙酮,分析纯,衢州巨化试剂有限公司。

1.2 供试土壤

供试土壤为青紫泥,采自浙江省嘉兴市农科所实验田,土壤风干后过 2 mm 的尼龙筛备用。其基本理化性质见表 2。供试青紫泥土样中 PCP 空白本底值未测出。

表 1 五氯酚的一些基本理化参数
Table 1 Physical and chemical properties of PCP

名称	分子式	分子量	溶解度/mg·L ⁻¹	Kow
PCP	C ₆ Cl ₅ OH	266.34	14.0	4.4

表 2 供试土壤的基本理化性质

Table 2 Basic physical and chemical properties of the experimental soil

土壤类型	有机质/g·kg ⁻¹	pH/Soil:H ₂ O=1:2.5	CEC/cmol·kg ⁻¹	P/%	N/%
青紫泥	51.63	6.10	4.28	0.03	0.214

0 mol·L⁻¹ 2 个浓度下直接取上清液过 0.45 μm 滤膜后测定。

(3)萃取时间选择:分别采用一次持续超声萃取 20、60 min 2 种超声时间。

(4)萃取温度选择:分别用加冰块控制 0℃和水浴加热 40℃方法保持 2 种萃取温度。

1.3.3 五氯酚萃取条件的优化

取 28 个人工配置的受不同浓度五氯酚污染达 9 个月的青紫泥土样,一组为新鲜土,在保持其培养过程中水分(青紫泥最大田间吃水量的 50%~60%)不变的情况下过 10 目筛后直接提取并分析,同时测定其含水率(最后试验结果均以干土重计)。一组为风干土,研钵中磨细(40 目)后分析。比较新鲜土样和风干土样的提取效率。另外,选取 20 号污染土样作 1 次和 3

次提取的对比。

1.4 试验方法

1.4.1 萃取

称取相当于 2.00 g 风干土重的处理土样(40 目)于 50 mL 带塞的三角瓶中,分别加入不同浓度的硫酸溶液进行酸化,再加入 10.0 mL 的乙腈或二氯甲烷提取液,混匀,称重,振荡 30 min,然后超声萃取 20 或 60 min,同时加温保持在 40℃左右(萃取温度选择时加入冰块控制低温状态),离心,留上清液待用。

1.4.2 测定

样品分析在配置有 UV 检测器的高效液相色谱仪(HPLC,Agilent 1100)上进行,色谱柱为 C-18 柱,柱温 40℃。流动相:A(1%乙酸)10%,B(甲醇)90%,流速 1 mL·min⁻¹,进样量 100 μL。检测波长 225 nm。外标法定量。

1.5 标准曲线

将 100 mg·L⁻¹ 的五氯酚甲醇标准溶液用甲醇稀释,最终配制成 2 组 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mg·L⁻¹ 的系列标准溶液后用高效液相色谱进行测定。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

五氯酚的高效液相色谱测定结果见图 1、图 2,表明在 0.1 至 2.0 mg·L⁻¹ 浓度范围内,五氯酚浓度(C_{pcp},mg·L⁻¹)与色谱峰面积(A)有很好的线性关系,其回归方程为:

$$A=331.25C_{pcp}+17.248, r^2=0.9998$$

说明本方法适用于五氯酚的定量分析。

2.2 萃取条件的选择

2.2.1 萃取剂选择

选用乙腈、二氯甲烷作为萃取剂对青紫泥中五氯酚进行超声萃取,发现乙腈作为萃取剂,回收率仅为 49.3%;二氯甲烷作为萃取剂则可以达到 78.9%。

2.2.2 萃取酸度

本试验供试土壤青紫泥的 pH 为 6.10(土水比为 2.5),而五氯酚的 pKa 值为 4.93,当土壤溶液 pH 大于 pKa 值时,土壤中的五氯酚一部分是以离子态存在于土壤中,选择低 pH 的环境,可以使之以分子态析出,提高其在有机溶剂中的分配效率^[8]。本试验采用不同浓度的硫酸对萃取剂进行酸化处理,结果表明,酸化处理对二氯甲烷的提取效率没有明显影响,但却大大提高乙腈的提取效率,见图 3,其中 0.045 mol·L⁻¹ 硫酸溶液酸化的样品回收率最高,达 100.1%。高酸化处

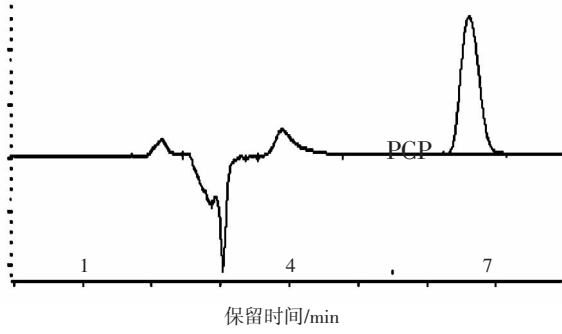


图 1 PCP 在 HPLC 中的出峰情况

Figure 1 The high performance Liquid chromatogram of PCP

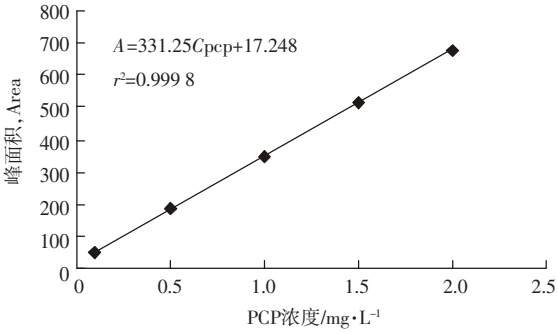


图 2 PCP 浓度与 HPLC 峰面积的线性关系

Figure 2 The correlation curve of PCP concentrations and peak areas

理样品的回收率反而有所下降,原因主要是高酸化处理的样品增加了浓缩和再萃取环节。

2.2.3 萃取时间

本试验采用一次超声萃取,结果表明,5×10⁴Hz 的超声波萃取 20 min 的回收率显著低于 60 min 的萃取结果,并达到 5%显著差异水平,超声萃取 60 min 的回收率达到 92.0%,见图 4。说明供试青紫泥中粘粒含量较高,短时间内样品不易分散,提取时间不宜过短。

2.2.4 萃取温度

试验中以乙腈加 0.045 mol·L⁻¹ 硫酸为萃取剂设计了 0℃(加冰块冷却)和 40℃ 2 种提取温度,试验结果如图 5 所示。青紫泥中 PCP 在 40℃时的回收率显著高于 0℃,原因可能是较高温度加快了提取剂与土壤颗粒的接触频率,从而提高 PCP 的回收率,但温度的升高使得有机溶剂挥发可能加快。本试验采用称重法估算超声期间溶剂的损失,结果发现萃取条件控制在 40℃时乙腈挥发损失极少,乙腈提取液在提取过程中损失量都小于 0.2%。

根据上述分析,确定了青紫泥中 PCP 的测定方

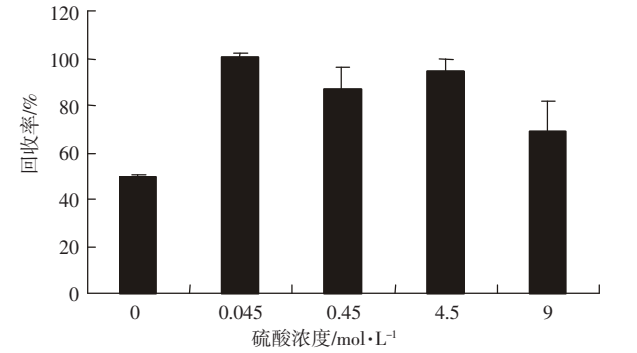


图 3 酸化(硫酸)对 PCP 回收率的影响
(以乙腈为萃取剂,40℃萃取 60 min)

Figure 3 Effects of different H₂SO₄ concentrations on PCP recovery
(using acetonitrile as extraction reagent,then ultrasonic radiating
for 60 min under 40℃)

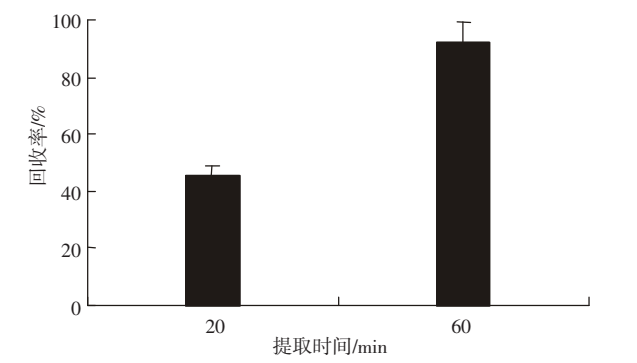


图 4 不同提取时间对 PCP 回收率的影响
(以乙腈为萃取剂,40℃,0.045 mol·L⁻¹ 硫酸酸化)

Figure 4 Effects of different extraction times on PCP recovery
(using acetonitrile as extraction reagent,adding 0.045mol·L⁻¹H₂SO₄
to acidify,then ultrasonic radiating under 40℃)

法,即以乙腈作为提取剂,加 0.045 mol·L⁻¹ 的硫酸酸化,振荡 30 min,40℃超声萃取 60 min,得到了青紫泥中较高的 PCP 回收率,见表 3。

2.3 土壤五氯酚萃取条件的进一步优化

土壤五氯酚萃取条件的选择均采用人工制备污染土进行的。由于培养时间较短,有机污染物与土壤的结合强度可能较弱,易于提取。自然条件下五氯酚往往在土壤中已存在相当长的时间,因此有机污染物与土壤的结合强度可能较强,土壤的分散性以及提取次数可能会影响其提取效率。基于上述考虑,采用已老化 9 个月的污染土对土壤五氯酚的提取条件进一

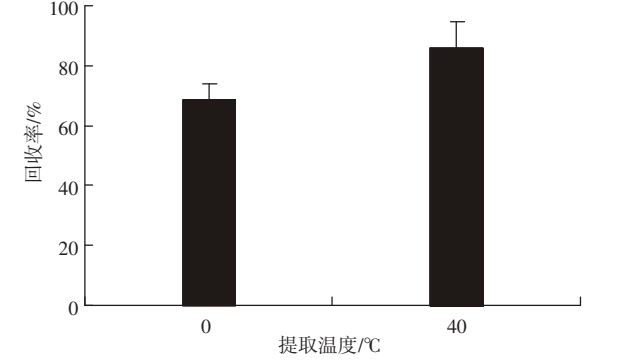


图 5 不同提取温度对 PCP 回收率的影响
(以乙腈为萃取剂,0.045 mol·L⁻¹ 硫酸酸化,萃取 60 min)

Figure 5 Effects of different extraction temperatures
on PCP recovery
(using acetonitrile as extraction reagent,adding 0.045 mol·L⁻¹
H₂SO₄ to acidify ,then ultrasonic radiating for 60 min)

步优化。

2.3.1 土壤分散性

选取 28 个人工配置的受五氯酚不同浓度污染达 9 个月的青紫泥土样作比较试验(以乙腈为萃取剂,0.045 mol·L⁻¹ 硫酸酸化,40℃萃取 60 min)。一组直接采用新鲜土,一组采用风干土(40 目)。发现对风干土中 PCP 的提取能力远高于新鲜土,其提取能力是新鲜土的 1.2~5.8 倍,见图 6。因此认为土壤的分散性对五氯酚的提取能力影响很大,供试土壤样品应预先风干、磨细。

2.3.2 萃取次数

采用乙腈加 0.045 mol·L⁻¹ 硫酸作为提取剂对 20 号污染土壤在 40℃下每次萃取 60 min,进行多次提取。结果表明,第 1 次萃取已比较完全,占 3 次提取总量的 97%,第 2 次和第 3 次之和仅占 3%,见图 7。因此选择一次超声提取是合理的。

3 结论

超声萃取结合高效液相色谱技术可以实现青紫泥中五氯酚残留的快速、准确、有效分析。对于青紫泥中五氯酚的超声萃取-高效液相色谱测定方法,以乙腈作为提取剂,加 0.045 mol·L⁻¹ 的硫酸酸化,振荡 30 min,40℃超声萃取 60 min,可以得到较高的回收率。由于土壤的分散能力对五氯酚的提取能力影响很大,

表 3 青紫泥中 PCP 测定结果的重现性

Table 3 The reproducibility of measuring results of PCP in Qingzi Soil									
土样类型	回收率/%							回收率 平均值/%	相对 标准偏差/%
	1	2	3	4	5	6	7		
青紫泥	89.0	87.8	100.0	95.8	104.0	102.4	108.3	99.0	

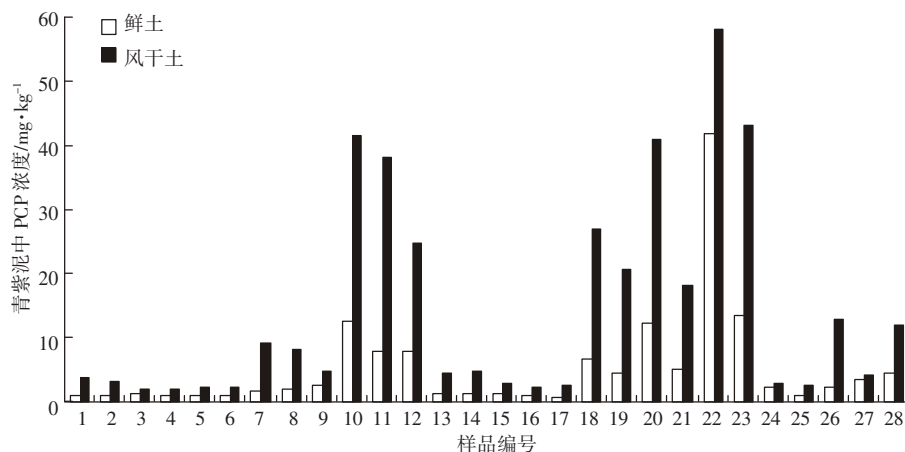


图6 风干土和鲜土中测定结果的浓度差异

Figure 6 PCP contents in air-dried soil and fresh soil

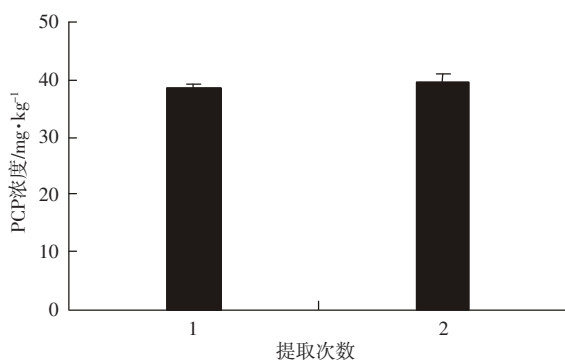


图7 一次提取和三次提取时青紫泥中PCP提取效果的比较

Figure 7 Comparison of extraction efficiency between one time and three times extraction

试验发现供试青紫泥样品经风干、磨细可以较鲜土获得更好的超声萃取效果,而且一次超声处理就可实现老化青紫泥土样中残留五氯酚97%的提取,一次超声提取是合理、可行的。

参考文献:

[1] McGrath R, Singleton I. Pentachlorophenol transformation in soil: a toxicological assessment [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2000, 32:1311-1314.

[2] Namhyun Chung, Steven D Aust. Degradation of pentachlorophenol in soil by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1995, 41:177-183.

[3] Rudolph A Abramovitch, Michael Capracotta. Remediation of waters contaminated with pentachlorophenol [J]. *Chemosphere*, 2003, 50: 955-957.

[4] 孙磊, 蒋新, 周健民, 等. 五氯酚污染土壤的热修复初探 [J]. *土壤学报*, 2004, 41(30): 462-465.

[5] 徐向阳, 冯孝善. 五氯酚 (PCP) 污染土壤厌氧生物修复技术的初步研究 [J]. *应用生态学报*, 2001, 12(6): 439-442.

[6] Linda K Weavers, Noah Malmstadt, Michael R Hoffmann. Kinetics and mechanism of Pentachlorophenol degradation by sonication, ozonation, and sonolytic ozonation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2000, 34:1280-1285.

[7] Ken K C TSE, Shang-Lien LO, Jerry W H Wang. Pilot study of in-situ thermal treatment for the remediation of Pentachlorophenol-contaminated aquifers [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35:4910-4915.

[8] 孙磊, 蒋新, 周健民, 等. 红壤中痕量五氯酚的气相色谱测定 [J]. *分析化学*, 2003, 31(6): 716-719.

[9] 尚素芬, 蒋守规. 一氯酚三氯酚和五氯酚的高效液相色谱测定方法 [J]. *河北大学学报*, 1995, 15(4): 37-42.

[10] Oubina Anna, Puig David, Gascón Jordi, et al. Determination of pentachlorophenol in certified waste waters, soil samples and industrial effluents using ELISA and liquid solid extraction followed by liquid chromatography [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 346:49-59.

[11] Khodadoust Amid P, Suidan Makram T, Acheson Carolyn M, et al. Solvent extraction of Pentachlorophenol from contaminated soil [J]. *Chemosphere*, 1999, 38: 2681-2693.

[12] Polese Luciana, Ribeiro Maria Lúcia. Methods for determination of hexachlorobenzene and pentachlorophenol in soil samples [J]. *Talanta*, 1998, 46:915-920.

[13] Codognoto L, Zuin V G, Souza D De, et al. Electroanalytical and chromatographic determination of pentachlorophenol and related molecules in a contaminated soil: a real case example [J]. *Microchemical Journal*, 2004(7):177-184.

[14] Amid P Khodadoust, Makram T Suidan, Carolyn M Acheson, et al. Solvent extraction of pentachlorophenol from contaminated soils using water-ethanol mixtures [J]. *Chemosphere*, 1999, 38(11):2681-2693.

[15] 吴坤, 徐淑霞, 陈红歌, 等. 土壤中五氯酚的测定及其生物降解研究 [J]. *河南农业科学*, 2003, 5: 30-33.

[16] You C N, Liu J C. Desorptive behavior of chlorophenols in contaminated soils [J]. *Water Science and Technology*, 1996, 33(6):263-270.

[17] Monika Walter, Kirsty S H, Boyd-Wilson, et al. Laboratory trials on the bioremediation of aged pentachlorophenol residues [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2005, (55):121-130.

[18] C Barbeau L Deschenes. Bioremediation of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 1997, 48:745-752.

[19] Teixeira Castro Jacira, Korn Mauro. Deleterious effect of ammonium extraction from soil assisted by ultrasound [J]. *Microchemical Journal*, 2004, 78:41-45.

[20] Priego-López E, Luque de Castro M D. Ultrasound-assisted extraction of nitropolycyclic aromatic hydrocarbons from soil prior to gas chromatography-mass detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1018:1-6.